

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



JCG18 US PRO
09/769407
01/26/01

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 03 586.8

Anmeldestag: 28. Januar 2000

Anmelder/Inhaber: Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Synthese von Acetyl-amidiniophenyl-
alanyl-cyclohexylglycyl-pyridinioalaninamiden

IPC: C 07 K 5/08

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

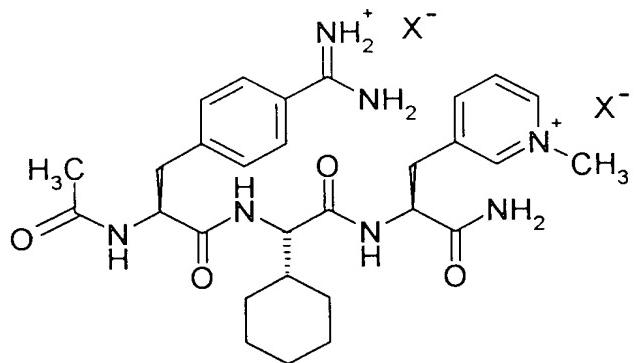
München, den 3. Januar 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Weihmair

Verfahren zur Synthese von Acetyl-amidiniophenylalanyl-cyclohexylglycyl-pyridinioalaninamiden

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Acetyl-amidiniophenylalanyl-cyclohexylglycyl-pyridinioalaninamiden der Formel I,



10

in der die Anionen X für physiologisch verträgliche Anionen stehen, und deren Analogen, die wirksame Hemmstoffe des Blutgerinnungsfaktors Xa sind und sich zum Beispiel zur Verhinderung von Thrombosen eignen. Das erfindungsgemäße Verfahren ist gekennzeichnet durch die Kupplung von 2-[2-Acetylamino-3-(4-amidinophenyl)-propionylamino]-2-cyclohexyl-essigsäure, die aus 2-[2-Acetylamino-3-(4-cyanphenyl)-acryloylamino]-2-cyclohexyl-essigsäure durch asymmetrische Hydrierung und Überführung der Cyangruppe in das Amidin erhalten wird, oder einem Salz davon, mit einem 3-(2-Amino-2-carbamoyl-ethyl)-1-methyl-pyridiniumsalz. Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Ausgangsverbindungen und Zwischenprodukte dieses Verfahrens, Verfahren zu deren Herstellung und das Acetyl-(S)-4-amidiniophenylalanyl-(S)-cyclohexylglycyl-(S)-(1-methyl-3-pyridinio)alaninamid als Ditosylat-Salz.

Bei bestimmten Krankheitsbildern wie zum Beispiel tiefer Venenthrombose, hohem Risiko für Herzinfarkt oder stabiler oder instabiler Angina pectoris können

Störungen des Blutgerinnungssystems und die Bildung von Thromben zu einem tödlichen Verlauf führen. Bei der Verhinderung von Thromben ist es jedoch nicht wünschenswert, das Blutgerinnungssystem übermäßig oder gar vollständig zu inhibieren, da sonst lebensbedrohliche Blutungen resultieren können. Die 5 gegenwärtig genutzten Gerinnungsinhibitoren wie Heparin, Aspirin oder Hirudin haben kein optimales Eigenschaftsprofil, da sie mit Komplikationen durch Blutungen verbunden sein können und bei den genannten Krankheitsbildern in einem Teil der Fälle den Gefäßverschluss nicht verhindern können. Tierversuche haben gezeigt, dass spezifische Inhibitoren des Blutgerinnungsenzyms Faktor Xa 10 zuverlässig die Bildung von Thromben verhindern, ohne dass Blutungen auftreten, wie sie bei Anwendung direkter Thrombin-Inhibitoren beobachtet werden. Die 15 Verbindungen der Formel I und Analoge davon sind spezifische und hochpotente Hemmstoffe des Faktors Xa, die nach intravenöser, subkutaner und oraler Verabreichung wirksam sind.

15

Verbindungen der Formel I und Analoge davon sind beschrieben in der WO-A-95/29189 und der korrespondierenden US-A-5849510. Gemäß der WO-A-95/29189 erfolgt ihre Herstellung durch Festphasensynthese unter Verwendung von Schutzgruppentechniken, wobei 3-Pyridylalanin an ein Harz mit einem Knorr-Linker 20 gekuppelt wird, dann mit Cyclohexylglycin gekuppelt wird, das Pyridin-Stickstoffatom quaternisiert wird, das Dipeptid mit Acetyl-4-amidinophenylalanin, das aus 4-Cyanphenylalanin hergestellt wird, gekuppelt wird und nach Abspaltung vom Harz das Produkt chromatographisch gereinigt wird. Dieses Festphasen-Verfahren ist ungeeignet für die Herstellung in Multi-kg-Mengen, wie sie für 25 Entwicklungsarbeiten wie toxikologische und klinische Studien benötigt werden, oder gar für die Synthese im Produktionsmaßstab.

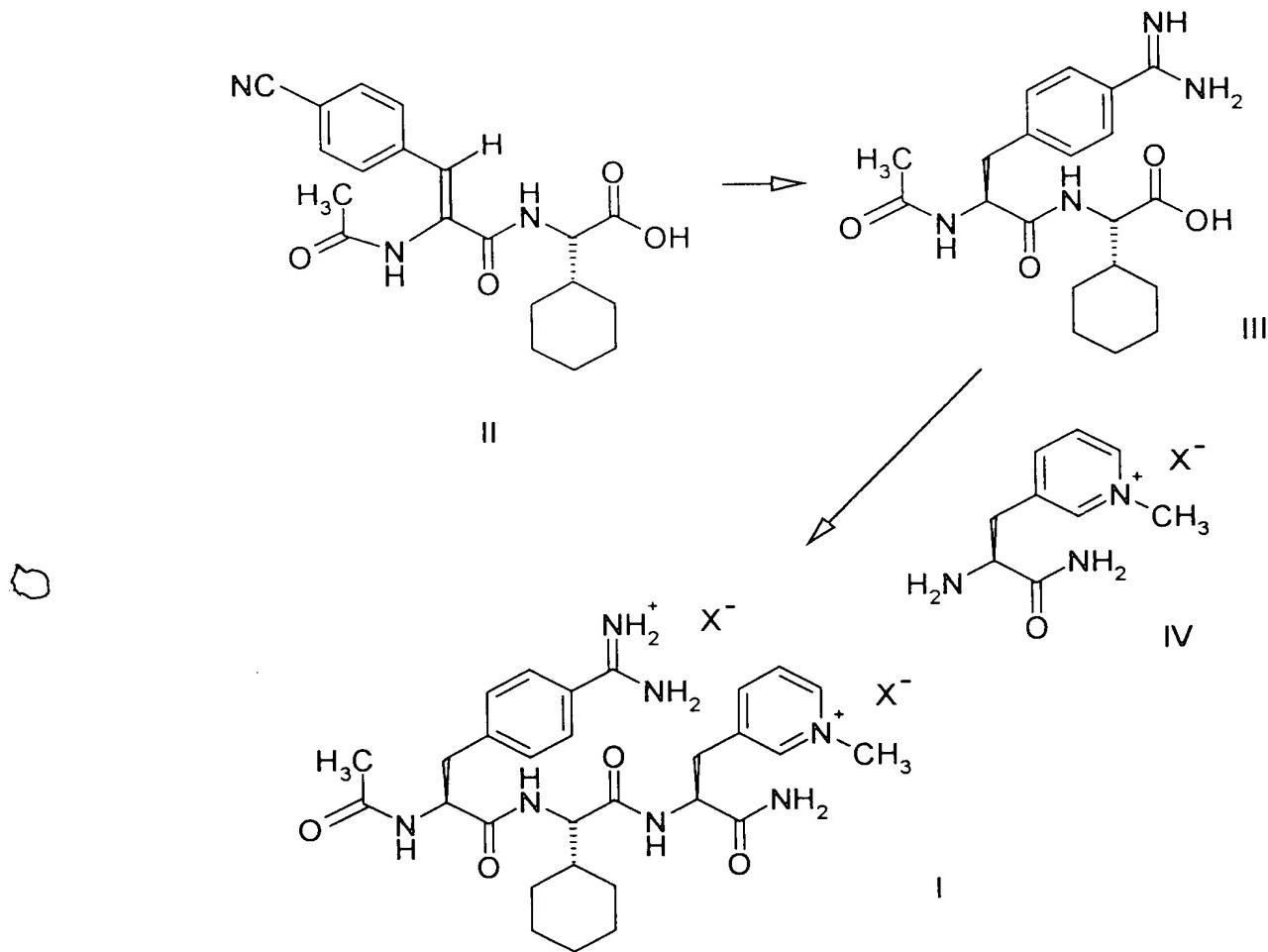
Ein pharmazeutischer Wirkstoff ist nur dann als Entwicklungsprodukt und für die spätere Anwendung am Patienten akzeptabel, wenn die Herstellung in dem 30 benötigten Maßstab mit adäquater Reinheit erfolgen kann, wobei die Reinheit im Fall von Verbindungen mit Asymmetriezentren insbesondere auch die stereochemische Reinheit umfaßt. Die Verbindungen der Formel I enthalten ein

peptidisches Dikation, das positive Ladungen in der Amidinium-Gruppierung und der N-Methylpyridinium-Gruppierung trägt. Von den Verbindungen der Formel I mit verschiedenen Anionen X^- wie Acetat, Chlorid, Fumarat, Benzoat, Tartrat, Maleinat, Trifluoracetat, Tosylat, Sulfat oder Pamoat erwies sich nur das Trifluoracetat-Salz 5 (Verbindung der Formel I, $X^- = CF_3CO_2^-$) als kristallin. Das Trifluoracetat-Salz ist aber thermisch nicht hinreichend stabil und nicht hinreichend lagerfähig und ist auch aus physiologischer Sicht für Langzeitanwendungen weniger bevorzugt. Alle anderen Salze der Verbindung der Formel I erwiesen sich in ihren Röntgenpulverdiagrammen als notorisch amorph. Die amorphe Natur der Salze ist 10 ein wesentliches Problem der Herstellung einer Verbindung der Formel I in größerem Maßstab, da sie eine Umkristallisation unmöglich macht und die fraktionierte Fällung als einzige Reinigungsmethode verbleibt, die in großem Maßstab gut praktikabel ist. Die Reinigungseffizienz einer Fällung ist aber natürlich viel geringer als die einer Kristallisation und es ist daher notwendig, bereits die rohe 15 Verbindung der Formel I mit einem geeigneten Anion X in einer möglichst glatt verlaufenden Reaktion herzustellen, um schließlich ein Produkt von klinisch akzeptabler Reinheit durch fraktionierte Fällung zu erhalten. Das Herstellverfahren muß aber natürlich auch hinsichtlich Faktoren wie beispielsweise der Ausbeute, der Stufenzahl oder der Verfügbarkeit und des Preises der Ausgangssubstanzen 20 akzeptabel sein.

Ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel I, das nicht an der Festphase durchgeführt wird, ist in der WO-A-97/22712 beschrieben. In diesem Verfahren erfolgt die Verknüpfung der drei in den Verbindungen der Formel I 25 enthaltenen Aminosäureeinheiten in derselben Reihenfolge wie gemäß dem Verfahren in der WO-A-96/29189. Zunächst wird (S)-3-Pyridylalanin, das an der Aminogruppe durch eine tert-Butoxycarbonylgruppe (Boc) geschützt ist, in das Amid überführt, dieses dann nach Abspaltung der Schutzgruppe mit (S)-N-Boc-Cyclohexylglycin gekuppelt, das Diipeptid nach Abspaltung der Schutzgruppe mit 30 Acetyl-(S)-4-cyanphenylalanin gekuppelt und in dem erhaltenen Tripeptid durch Umsetzung mit Schwefelwasserstoff, Methyliodid und Ammoniak die Cyangruppe in das Amidin überführt und das Pyridin-Stickstoffatom quaternisiert. Das Produkt wird

- in Form des Trifluoressigsäuresalzes isoliert durch Eindampfen der Reaktionslösung des letztes Reaktionsschrittes, Auflösen des Rückstandes, Zusetzen von Trifluoressigsäure, Filtern und Gefriertrocknen. Es zeigt sich jedoch, dass die Reinheit des nach diesem Verfahren erhaltenen Produkts
- 5 einschließlich der stereochemischen Reinheit nicht den Anforderungen genügt und eine verlustreiche und aufwendige, im großen Maßstab nicht mehr akzeptable chromatographische Reinigung erforderlich ist. Um mögliche Bedenken aus physiologischer Sicht hinsichtlich des Trifluoracetat-Anions zu vermeiden, muß zudem eine Überführung in ein anderes Salz durch Ionenaustausch-
- 10 Chromatographie erfolgen. Weiter hat das Verfahren wesentliche technische Nachteile, zum Beispiel die Verwendung von Lösungsmitteln wie Diethylether oder Hexan oder das Arbeiten bei tiefen Temperaturen, und es verwendet teure Ausgangssubstanzen (die in den Verbindungen der Formel I als Bausteine enthaltenen drei enantiomerenreinen unnatürlichen α -Aminosäuren (S)-3-
- 15 Pyridylalanin, (S)-Cyclohexylglycin und (S)-4-Amidinophenylalanin (bzw. (S)-4-Cyanphenylalanin; die Amidino-Gruppe kann aus der Cyan-Gruppe geformt werden) sind in zwar kleinen Mengen kommerziell erhältlich, jedoch sehr teuer). Es besteht also weiterhin Bedarf an einem glatt verlaufenden Verfahren für die Herstellung der Verbindungen der Formel I mit geeignetem Anion X in größerem
- 20 Maßstab.

 Diese Aufgabe wird gelöst durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel I, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die Verbindung der Formel II durch katalytische Hydrierung und Überführung der 25 Cyangruppe in die Amidinogruppe in die Verbindung der Formel III oder deren Salz mit der Säure HX überführt wird und die Verbindung der Formel III oder deren Salz mit der Säure HX mit einer Verbindung der Formel IV oder deren Salz mit der Säure HX zur Verbindung der Formel I umgesetzt wird, wobei die Anionen X für physiologisch verträgliche Anionen stehen.



Während der Aufbau des Moleküls der Formel I bei den bekannten Verfahren durch Kupplung des C-terminalen Dipeptids aus Pyridylalanin und Cyclohexylglycin mit

- 5 der N-terminalen Aminosäure Amidinophenylalanin (bzw. Cyanphenylalanin) erfolgt, erfolgt der Aufbau bei dem erfindungsgemäßen Verfahren durch Kupplung des N-terminalen Dipeptids aus Amidinophenylalanin und Cyclohexylglycin mit der C-terminalen Aminosäure Pyridylalanin. Zudem entsteht im erfindungsgemäßen Verfahren in dem Dipeptid, das in diese Kupplung eingesetzt wird, die

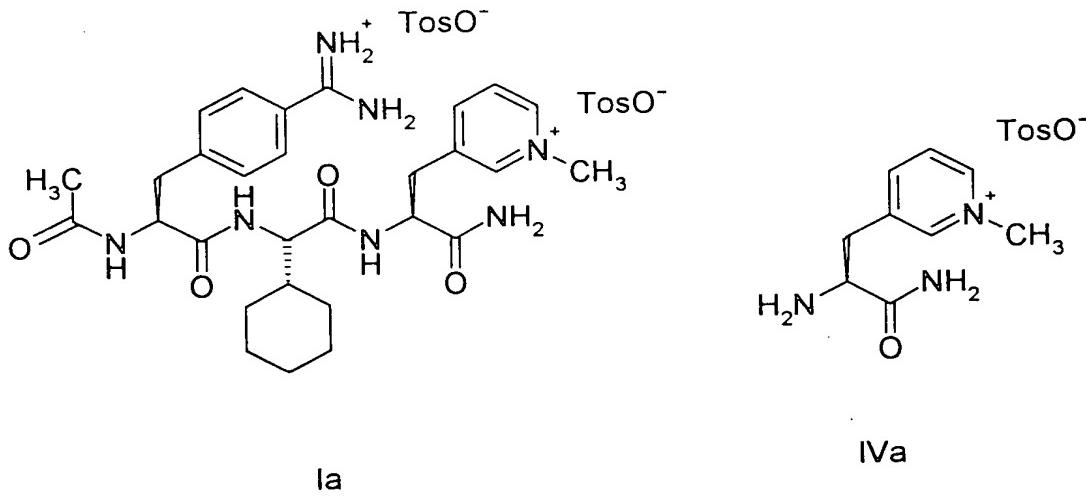
10 Struktureinheit CH-CO-NH-CH-CO mit den zwei epimerisierungsempfindlichen Chiralitätszentren nicht wie bei den bekannten Verfahren in einer Kupplungsreaktion von zwei chiralen α -Aminosäuren, sondern durch eine asymmetrische Hydrierung. Die Peptidkupplung in dem erfindungsgemäßen Verfahren verläuft sauber und quantitativ unter Verwendung billiger Reagenzien. Es

erfolgt nur eine sehr geringe Epimerisierung. Die Verbindungen der Formel I werden in hoher Ausbeute und in hoher chemischer Reinheit und stereochemischer Reinheit durch fraktionierte Fällung erhalten. Zur Erzielung der gewünschten Reinheiten sind keine chromatographischen Reinigungen oder teure und aufwendige Technologien wie eine Gefriertrocknung erforderlich.

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch analoge Verfahren zu dem obigen Verfahren, in denen unter Verwendung von Ausgangsverbindungen mit anderer Konfiguration Stereoisomere der Verbindungen der Formel I hergestellt werden, zum Beispiel Verbindungen, in denen das Chiralitätszentrum in der Amidinophenylalanineinheit (R)-Konfiguration aufweist und/oder das Chiralitätszentrum in der Cyclohexylglycineinheit (R)-Konfiguration aufweist und/oder das Chiralitätszentrum in der Pyridylalanineinheit (R)-Konfiguration aufweist, oder Verbindungen, die an einem oder mehreren der Chiralitätszentren als (RS)-Gemische vorliegen. Gegenstand der Erfindung sind weiterhin analoge Verfahren zu den obigen Verfahren, in denen unter Verwendung der entsprechenden Ausgangsverbindungen Analoge von Verbindungen der Formel I (und deren Stereoisomeren) hergestellt werden, zum Beispiel Verbindungen, die an Stelle der Methylgruppe in der Acetylaminogruppe in der Amidinophenylalanineinheit eine (C₁-C₄)-Alkylgruppe enthalten und/oder an Stelle der Methylgruppe am quartären Pyridin-Stickstoffatom eine (C₁-C₄)-Alkylgruppe enthalten, wobei Beispiele für solche (C₁-C₄)-Alkylgruppen Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl oder tert-Butyl sind.
- Die physiologisch verträglichen Anionen X in den Verbindungen der Formeln I und IV und der Säure HX können zum Beispiel Chlorid, Bromid, Iodid, Methansulfonat, Toluol-4-sulfonat, Acetat, Benzoat und andere sein. Im Falle eines mehrwertigen Anions, zum Beispiel Sulfat, steht X für ein Anionenäquivalent. Bevorzugt steht X für ein Anion, gegen das aus physiologischer Sicht auch bei längerer Anwendung der Verbindungen der Formel I in höheren Dosen keine Bedenken bestehen, und/oder das den Verbindungen der Formel I günstige Eigenschaften für die pharmazeutische Verarbeitung und die pharmakologische Wirkung verleiht, zum

Beispiel eine geeignete Wasserlöslichkeit, und/oder das den Verbindungen der Formeln I und IV günstige Eigenschaften bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens verleiht, zum Beispiel Einfachheit des Verfahrens, geeignete Löslichkeiten in den verwendeten Lösungsmitteln, gute Fällbarkeit, gute

- 5 Filtrierbarkeit, usw. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung steht X für Toluol-4-sulfonat (= 4-Methylbenzolsulfonat = $4\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_3^-$ = Tosylat = TosO^-) oder Iodid, in einer besonders bevorzugten Ausführungsform steht X für Toluol-4-sulfonat. In dieser besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung also ein Verfahren zur Herstellung der
 10 Verbindung der Formel I in der Form des Ditosylat-Salzes, das heißt der Verbindung der Formel Ia,



- 15 das dadurch charakterisiert ist, dass die Verbindung der Formel II durch katalytische Hydrierung und Überführung der Cyangruppe in die Amidinogruppe in die Verbindung der Formel III oder das Toluol-4-sulfonsäuresalz davon überführt wird und die Verbindung der Formel III oder das Toluolsulfonsäuresalz davon mit der Verbindung der Formel IVa oder dem Toluol-4-sulfonsäuresalz davon zur
 20 Verbindung der Formel Ia umgesetzt wird. Gegen das in der Verbindung der Formel Ia enthaltene Tosylat-Anion bestehen aus physiologischer Sicht keine Bedenken, und die Verbindung der Formel Ia zeichnet sich insbesondere durch besonders gute Eigenschaften bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens aus.

Sie ist gut fällbar und gut filtrierbar und wird in besonders hoher Ausbeute und Reinheit erhalten. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Verbindung der Formel Ia per se und ihre Solvate, zum Beispiel Addukte mit Wasser oder Alkoholen, die Verwendung der Verbindung der Formel Ia als

5 Hemmstoff von Faktor Xa oder zur Behandlung oder Verhinderung von thromboembolischen Erkrankungen wie Thrombosen, Herzinfarkt oder Angina pectoris und die Verwendung der Verbindung der Formel Ia zur Herstellung von Arzneimitteln dafür, sowie pharmazeutische Präparate, die eine wirksame Menge der Verbindung der Formel Ia und einen pharmazeutisch verträglichen Träger

10 enthalten, das heißt einen oder mehrere pharmazeutisch verträgliche Trägerstoffe und/oder Zusatzstoffe. Nähere Angaben zur Verwendung der Verbindungen der Formel I einschließlich der Verbindung der Formel Ia und zu sie enthaltenden pharmazeutischen Präparaten sind in der WO-A-95/29189 und der US-A-5849510 angegeben, auf die hier Bezug genommen wird und deren Inhalt in dieser Hinsicht

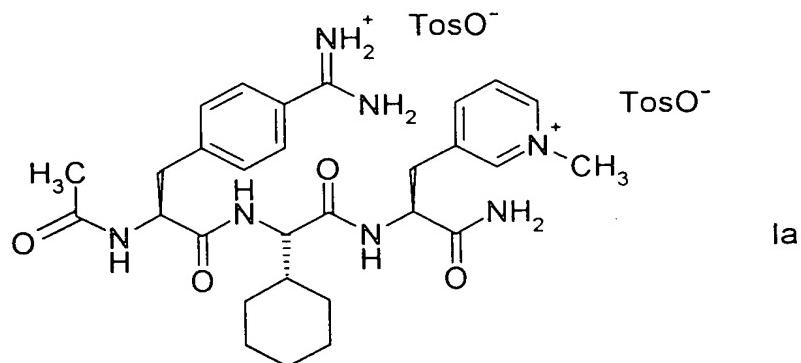
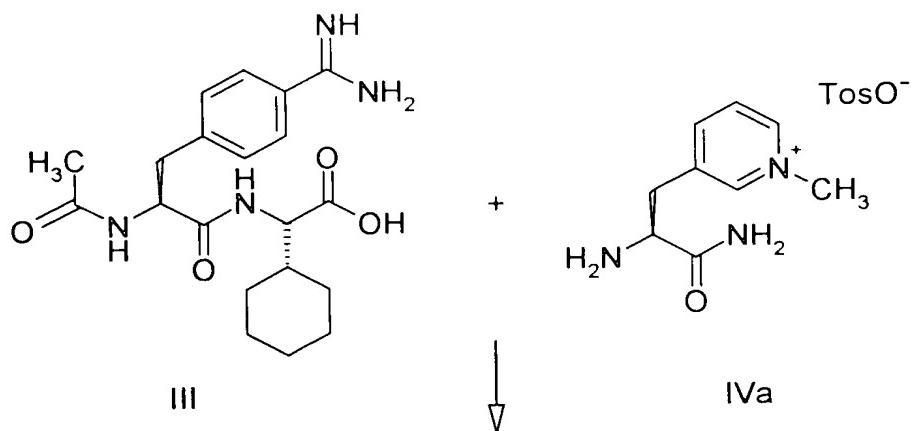
15 Bestandteil der vorliegenden Offenbarung ist.

Über die vorstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel I und zur Herstellung der Verbindung der Formel Ia aus den Verbindungen der Formeln II und IV oder deren Salzen hinaus betrifft die

20 vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel Ia, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die Verbindung der Formel III oder das Toluol-4-sulfonsäuresalz davon mit der Verbindung der Formel IVa oder dem Toluol-4-sulfonsäuresalz davon zur Verbindung der Formel Ia umgesetzt wird. Für dieses Verfahren, das die Verbindung der Formel I in der speziellen Ditosylat-Form

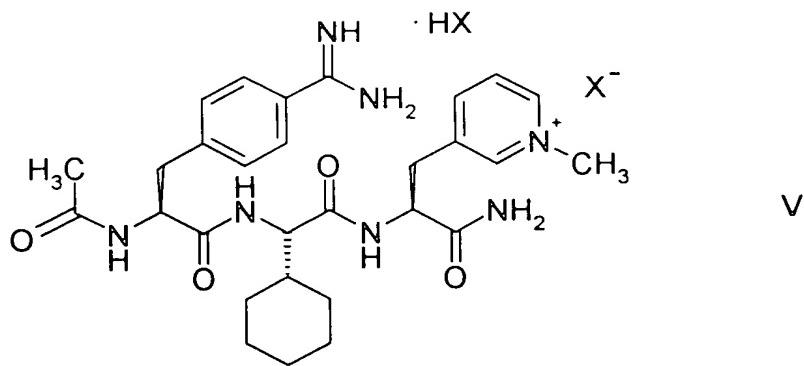
25 überraschend in besonders guter Ausbeute und Reinheit liefert und sich durch einen besonders glatten Verlauf und eine einfache Durchführung auszeichnet, gelten alle Erläuterungen, die oben und im folgenden für die Umsetzung der Verbindungen der Formeln III und IV oder deren Salzen, also für den Peptidkupplungsschritt im Rahmen des oben beschriebenen Verfahrens, gemacht

30 werden, entsprechend.



Die Verbindungen der Formel I können auch durch die Formel V dargestellt werden, in der zum Ausdruck gebracht wird, dass sie formal als

- 5 Säureadditionssalze aus der Säure HX und dem in der Formel V enthaltenen monokationischen Amidino-substituierten Pyridiniumsalz (mit freier Amidinogruppe (= Carbamimidoylgruppe = Amino-imino-methylgruppe $-\text{C}(=\text{NH})\text{-NH}_2$ an Stelle der protonierten, positiv geladenen Amidiniogruppe $-\text{C}(=\text{NH}_2^+)\text{-NH}_2$ in der Formel I) angesehen werden können. Entsprechend können die Verbindungen auch auf 10 unterschiedliche Arten

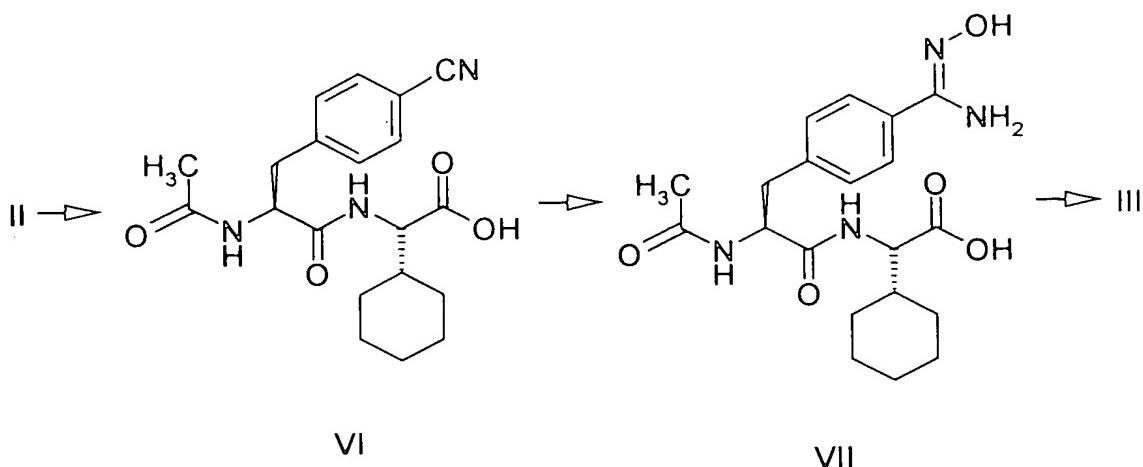


benannt werden, zum Beispiel als dikationische Pyridiniumsalze, die eine positiv geladene Amidiniogruppe als Substituenten tragen und die zwei negativ geladene

- 5 Anionen X als Gegenionen enthalten, oder als Säureadditionssalze aus der Säure HX und einem monokationischen Pyridiniumsalz, das eine freie Amidinogruppe als Substituenten trägt und ein negativ geladenes Anion X als Gegenion enthält. Je nach den jeweiligen Umständen können aber auch andere Benennungsweisen angebracht sein, zum Beispiel eine von der Peptidnomenklatur abgeleitete
- 10 Benennung, in der die positiv geladene Amidiniumgruppe (= Amidiniogruppe) oder die freie Amidingruppe wie auch die positiv geladene Pyridiniumgruppe (= Pyridiniogruppe) als Substituenten aufgefaßt werden. Die Verbindung der Formel Ia könnte zum Beispiel als 3-{(S)-2-[(S)-2-((S)-2-Acetylamino-3-(4-amidino-phenyl)-propionylamino)-2-cyclohexyl-acetylamino]-2-carbamoyl-ethyl}-1-methyl-pyridinium-
- 15 ditosylat oder 3-{(S)-2-[(S)-2-((S)-2-Acetylamino-3-(4-amidino-phenyl)-propionylamino)-2-cyclohexyl-acetylamino]-2-carbamoyl-ethyl}-1-methyl-pyridinium-tosylat-Toluol-4-sulfonsäuresalz oder auch N-Acetyl-4-(amino-imino-methyl)-L-phenylalanyl-L-2-cyclohexylglycyl-3-(1-methylpyridinium-3-yl)-L-alaninamid-tosylat-Toluol-4-sulfonsäuresalz bezeichnet werden.

20

- Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die Überführung der Verbindung der Formel II in die Verbindung der Formel III erfolgen, indem zunächst die Verbindung der Formel II stereoselektiv zur Verbindung der Formel VI hydriert wird und dann die Cyangruppe in das Amidin überführt wird, oder indem 25 zunächst die Cyangruppe in das Amidin überführt wird und dann die stereoselektive Hydrierung erfolgt.



Bevorzugt erfolgt zunächst die Hydrierung zur Verbindung der Formel VI und dann 5 die Überführung der Cyangruppe in das Amidin.

Die stereokontrollierte Hydrierung der C=C-Doppelbindung in dem Dehydrodipeptid der Formel II gelingt mit selektiven Heterogenkatalysatoren oder mit chiralen Übergangsmetallkomplexen. Bevorzugt wird sie mit chiralen Metallkomplexen von 10 Rhodium(I) oder Ruthenium(II), besonders bevorzugt von Rhodium (I), durchgeführt. Der Übergangsmetallkatalysator kann kationisch oder neutral sein, er kann in isolierter Form eingesetzt werden oder im Hydriermedium *in situ* aus dem chiralen Liganden und einem Präkatalysator, zum Beispiel einem Rhodiumsalz wie [Rh(COD)Cl]₂ oder [Rh(COD)₂]⁺ Y⁻ erzeugt werden (COD steht für 1,5-

15 Cyclooctadien, Y steht hier zum Beispiel für Tetrafluoroborat). Der Hydrierkatalysator kann homogen gelöst im Hydriermedium vorliegen oder er kann durch Verankerung an einem festen Träger heterogenisiert werden, wodurch er nach Hydrierende leicht per Filtration entfernt und erneut für den nächsten Hydrierungsansatz benutzt werden kann. Als chiraler Ligand in dem 20 Übergangsmetallkomplex können zahlreiche verschiedenartige Verbindungen dienen. Eine Übersicht über derartige chirale Liganden findet man zum Beispiel in I. Ojima, Catalytic Asymmetric Synthesis, Seite 445 - 447, VCH, New York 1993. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird für die asymmetrische Hydrierung der Verbindung der Formel II zur Verbindung der

Formel VI ein Rhodium(I)-Komplex mit einem chiralen Phosphin als Liganden eingesetzt. Besonders bevorzugt ist ein Rh(I)-(+)-BPPM-Katalysator, das heißt ein Rhodium(I)-Katalysator, der als chiralen Liganden (+)-(2R,4R)-1-tert-Butyloxycarbonyl-4-diphenylphosphino-2-(diphenylphosphinomethyl)-pyrrolidin 5 enthält (im molaren Verhältnis Rhodium zu Ligand = 1:1). Bevorzugt wird der Katalysator *in situ* aus einem Rhodiumsalz und dem Liganden hergestellt.

Als Lösungsmittel für die stereoselektive Hydrierung der Verbindung der Formel II zur Verbindung der Formel VI eignen sich zum Beispiel Ether, insbesondere 10 wassermischbare Ether, oder niedere Alkohole wie Methanol, Ethanol oder Isopropanol. Besonders bevorzugt wird die Hydrierung in Methanol durchgeführt.

Bevorzugt wird die Hydrierung bei Temperaturen von ca. 20 bis ca. 60 °C durchgeführt, besonders bevorzugt bei ca. 30 bis ca. 50 °C, zum Beispiel bei ca. 40 °C. Der eingestellte Wasserstoffdruck hängt von der verwendeten Apparatur ab, 15 bevorzugt wird ein Wasserstoffdruck von ca. 1 bis ca. 20 bar, besonders bevorzugt von ca. 5 bis ca. 15 bar, eingestellt, zum Beispiel von ca. 10 bar. Zur Steigerung der Effizienz der Hydrierung wird unter möglichst weitgehendem Sauerstoffausschluß und unter möglichst intensiver Durchmischung gearbeitet. Die Isolierung des Hydrierungsprodukts kann in einfacher Weise durch Zusatz von 20 Wasser und Abfiltrieren oder Abzentrifugieren des ausgefallenen Niederschlages erfolgen. Die asymmetrische Hydrierung verläuft mit sehr hoher Stereoselektivität und Ausbeute und liefert die Verbindung der Formel VI mit einem

Diastereomerenüberschuß von 98.4 % d. e. an (S,S)-Isomer im Rohprodukt und 99.5 % d.e. im isolierten Produkt bei einer isolierten Ausbeute von 97 %. Zudem 25 werden diese hervorragenden Ergebnisse bei sehr hohen Substrat/Katalysator-Verhältnissen von ca. 2000:1 bis ca. 5000:1 erzielt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verbindung der Formel VI per se, also die (S)-2-[(S)-2-Acetylamino-3-(4-cyanphenyl)-propionylamino]-2-30 cyclohexyl-essigsäure sowie ihre Salze, zum Beispiel als Alkali- oder Erdalkalimetallsalze wie das Natriumsalz oder das Kaliumsalz, das beschriebene

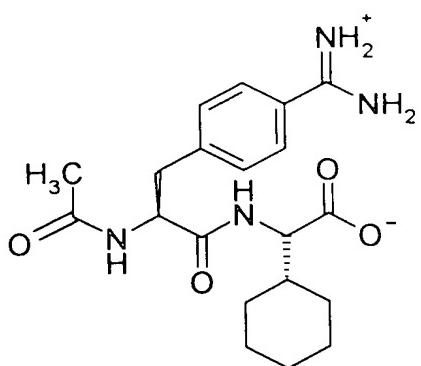
Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung als Zwischenprodukt, insbesondere als Zwischenprodukt für Arzneimittelwirkstoffe.

Die Überführung der Cyangruppe in der Verbindung der Formel VI in das Amidin
5 kann nach verschiedenen, dem Fachmann an sich bekannten Methoden erfolgen, zum Beispiel nach der in der WO-A-97/22712 beschriebenen Methode, die aber für eine Durchführung im technischen Maßstab eine Reihe von Nachteilen aufweist, zum Beispiel die Verwendung von Schwefelwasserstoff. Bevorzugt erfolgt die Überführung, indem zunächst Hydroxylamin an die Cyangruppe in der Verbindung
10 der Formel VI addiert wird, wobei als Zwischenprodukt das N-Hydroxyamidin der Formel VII entsteht. Die Verbindung der Formel VII wird dann in einfacher Weise durch Hydrogenolyse, das heißt durch Umsetzung mit Wasserstoff in Gegenwart eines Hydrierkatalysators, in das Amidin der Formel III überführt. Das Prinzip dieser Reaktionssequenz ist zum Beispiel beschrieben in H. Jendralla et al., Tetrahedron
15 51 (1995) 12047.

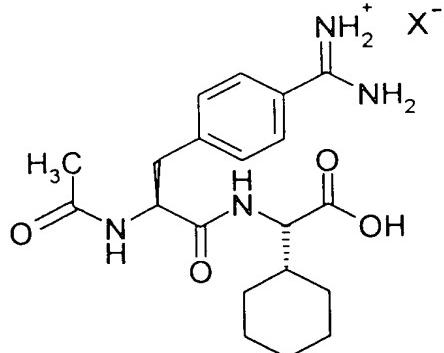
Das benötigte Hydroxylamin wird vorteilhaft in situ aus einem Hydroxylammoniumsalz, zum Beispiel Hydroxylammoniumchlorid oder Hydroxylammoniumsulfat, und einer Base, zum Beispiel einer basischen Natrium-
20 oder Kaliumverbindung oder einem tertiären Amin, hergestellt. Bevorzugt wird als Base für die Umsetzung der Verbindung der Formel VI mit einem Hydroxylammoniumsalz Natriumhydrogencarbonat eingesetzt. Das Hydroxylamin bzw. das Hydroxylammoniumsalz wird bevorzugt im Überschuß eingesetzt, zum Beispiel in einer Menge von ca. 1 bis ca. 2 mol pro mol der Verbindung der Formel
25 VI. Als Lösungsmittel für die Umsetzung mit Hydroxylamin bzw. einem Hydroxylammoniumsalz kommen zum Beispiel niedere Alkohole in Betracht. Ein besonders bevorzugtes Lösungsmittel ist Methanol. Die Herstellung der Verbindung der Formel VII erfolgt bevorzugt bei Temperaturen von ca. 20 bis ca. 65 °C, besonders bevorzugt bei Temperaturen von ca. 40 bis ca. 60 °C. Bei Verwendung
30 eines Hydroxylammoniumsalzes wird durch die zugesetzte Base auch die Carbonsäurefunktion in der Verbindung der Formel VI bzw. der in der Verbindung der Formel VII in das betreffende Salz überführt. Wenn eine Zwischenisolierung

des N-Hydroxyamidins der Formel VII gewünscht wird, kann diese Verbindung in vorteilhafter Weise in Form eines Salzes an der Carbonsäurefunktion isoliert werden, bei Verwendung einer Natriumverbindung als Base also in Form des Natriumsalzes der Carbonsäure, das durch Einengen des Reaktionsgemisches 5 und/oder Versetzen mit einem relativ unpolaren Lösungsmittel ausgefällt werden kann und durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt werden kann.

Die Hydrogenolyse der Verbindung der Formel VII oder eines Salzes davon zur Verbindung der Formel III kann unter den üblichen Bedingungen für katalytische 10 Hydrierungen erfolgen, zum Beispiel in Gegenwart eines üblichen Edelmetallkatalysators wie Palladium auf Kohle. Die Reaktionsbedingungen hängen wiederum von der eingesetzten Apparatur ab. Der Wasserstoffdruck kann beispielsweise im Bereich von 1 bis ca. 30 bar, insbesondere von ca. 5 bis ca. 25 bar, liegen und die Temperatur bei der Reaktion bei ca. 20 bis ca. 70 °C, 15 insbesondere bei ca. 40 bis ca. 60 °C. Bevorzugt wird die Hydrogenolyse in einem sauren Medium durchgeführt. Als Lösungsmittel für die Hydrogenolyse sind, insbesondere wenn das N-Hydroxyamidin in Form eines Salzes eingesetzt wird, polare Lösungsmittel bevorzugt, zum Beispiel niedere Alkohole oder Essigsäure. Ein besonders bevorzugtes Lösungsmittel ist Essigsäure. Das entstehende Amidin 20 der Formel III kann als solches oder in Form eines Säureadditionssalzes isoliert werden (das Amidin der Formel III als solches liegt nicht in der Form mit freier Amidinogruppe und Carbonsäuregruppe vor, die in der Formel III dargestellt ist, sondern in der tautomeren Form der Formel IIIa, das heißt als Betain oder



IIIa



VIII

- Zwitterion, in dem die Carbonsäuregruppe zum Carboxylat-Anion dissoziiert ist und die Amidin-Einheit zum Amidinium-Kation protoniert ist). In Gegenwart einer Säure, 5 die bereits während der Hydrogenolyse zugegen sein kann, wie zum Beispiel bei Verwendung von Essigsäure als Lösungsmittel, oder die bei der Aufarbeitung zugegeben werden kann, fällt die Verbindung der Formel III als Säureadditionssalz an. Mit einer Säure der Formel HX entsteht also ein Salz der Formel VIII, in der das Anion X bevorzugt für ein physiologisch verträgliches Anion steht, zum Beispiel für 10 Iodid oder Tosylat. Die Verbindungen der Formel VIII sind die oben erwähnten Salze aus der Säure HX und der Verbindung der Formel III. Wenn die Verbindung der Formel III in Form eines Säureadditionssalzes isoliert werden soll, wird die Säure HX bevorzugt so gewählt, dass die Verbindung der Formel VIII dasselbe 15 Anion wie die herzustellende Verbindung der Formel I enthält. Wenn also das ○ 20 Ditosylat-Salz der Formel Ia hergestellt werden soll und die Verbindung der Formel III als Salz isoliert werden soll, wird bevorzugt das Amidiniumtosylat der Formel VIII mit X = TosO⁻ hergestellt, indem zum Beispiel während der Aufarbeitung Toluol-4-sulfonsäure zugesetzt wird. In die Peptidkupplung mit der Verbindung der Formel IV können wie erwähnt sowohl die Verbindung der Formel III als solche, das heißt das Betain (oder Zwitterion) der Formel IIIa, als auch das Amidiniumsalz der Formel VIII (= Salz aus HX und der Verbindung der Formel III) eingesetzt werden und liefern ähnliche Reinheiten und Ausbeuten. Bevorzugt wird die Verbindung der Formel III als Betain (oder Zwitterion) der Formel IIIa isoliert und in die Peptidkupplung eingesetzt. Wenn die Hydrogenolyse in Essigsäure durchgeführt wird, kann das

zunächst entstehende Essigsäuresalz der Verbindung der Formel III (= Verbindung der Formel VIII mit X^- = Acetat) durch Umkristallisieren aus Wasser in das Betain umgewandelt werden.

- 5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Verbindungen der Formel III und ihre Salze bzw. die Verbindungen der Formeln IIIa und VIII per se, also die (S)-2-[(S)-2-Acetylamino-3-(4-amidino-phenyl)-propionylamino]-2-cyclohexyl-essigsäure als Betain (Zwitterion) und in Form ihrer Salze, das beschriebene Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung als Zwischenprodukte,
 10 insbesondere als Zwischenprodukte für Arzneimittelwirkstoffe.



Die Peptidkupplung des Amidins der Formel III (in der Form eines Salzes oder bevorzugt in der Form des Betains der Formel IIIa) mit dem Pyridinioalaninamid der Formel IV oder einem Salz davon zur Verbindung der Formel I kann nach den 15 üblichen, dem Fachmann bekannten Kupplungsmethoden durchgeführt werden. Das Pyridinioalaninamid wird bevorzugt in der Form eines Salzes mit der Säure HX eingesetzt, das heißt in der Form der Dikationsalze der Formel IX, in der die Anionen X bevorzugt für physiologisch verträgliche Anionen stehen.



20



- Zweckmäßigerweise ist das Anion X in der Verbindung der Formel IV oder der Verbindung der Formel IX und, wenn die Verbindung der Formel III in Form eines Salzes der Formel VIII eingesetzt wird, auch das Anion in der Verbindung der 25 Formel VIII das Anion der herzustellenden Verbindung der Formel I, im Falle der Herstellung der Verbindung der Formel Ia also das Tosylat-Anion. Wenn in die Peptidkupplung weder die Verbindung der Formel III noch die Verbindung der Formel IV in der Form eines Salzes mit der Säure HX eingesetzt wird, kann das

zweite Äquivalent des Anions X, das neben dem durch die Verbindung der Formel IV eingebrachten Äquivalent des Anions X für die Herstellung der Verbindung der Formel I benötigt wird, in Form eines Äquivalents der Säure HX oder eines Salzes der Säure HX bei der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches der Peptidkupplung 5 zugesetzt werden.

Als Beispiele für Peptidkupplungs-Agenzien, mit denen die Aktivierung der Carbonsäurefunktion bzw. Carboxylatfunktion in der Verbindung der Formel III (bzw. IIIa bzw. VIII) gelingt, seien Carbodiimide wie zum Beispiel

- 10 Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder Diisopropylcarbodiimid (DIC) oder Uroniumsalze wie O-[(Cyan-ethoxycarbonyl-methylen)-amino]-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TOTU) oder O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU) genannt. Carbodiimide werden bevorzugt in Gegenwart von Hydroxybenzotriazin- oder
- 15 Hydroxybenzotriazol-Reagenzien wie 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (= 3-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on = HOObt) oder 1-Hydroxy-1H-benzotriazol (HObt) eingesetzt. Bevorzugt sind Aktivierungs-Agenzien und Reaktionsbedingungen, bei denen Epimerisierungen an den chiralen Kohlenstoffatomen, insbesondere in der α -Position zur Carboxylgruppe in der
- 20 Verbindung der Formel III, in möglichst geringem Ausmaße erfolgen und somit die Bildung von diastereomeren Verunreinigungen möglichst unterbleibt. Besonders bevorzugte Aktivierungs-Agenzien unter diesem Aspekt sind HATU, DCC/HOObt und DCC/HObt. Insbesondere mit HATU oder DCC/HOObt wird bei der Kupplung ein Produkt erhalten, das nur 0.7 - 1.5 % Diastereomer im Rohprodukt enthält.
- 25 Speziell bevorzugt wegen seines wesentlich niedrigeren Preises ist DCC/HOObt. Aus Sicherheitsgründen wird das HOObt bevorzugt auf einem Träger, zum Beispiel auf Dicalite[®], eingesetzt.

- Die Kupplungsreaktion wird bevorzugt in einem polaren Lösungsmittel (oder einem 30 Gemisch von Lösungsmitteln) durchgeführt. In Betracht kommen protische Lösungsmittel wie niedere Alkohole, zum Beispiel Methanol, Ethanol oder Isopropanol, wobei von diesen Alkoholen Isopropanol bevorzugt ist, da die Gefahr

- einer Umwandlung der C-terminalen Amidgruppe in den Ester geringer ist als bei Verwendung von Methanol oder Ethanol. Besonders bevorzugt wird die Kupplung in aprotisch-polaren Lösungsmitteln durchgeführt, in denen sie besonders schnell und sauber verläuft, zum Beispiel in Amiden wie N,N-Dimethylformamid (DMF) oder
- 5 N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) oder in Dimethylsulfoxid (DMSO). Es können aber auch Lösungsmittel wie zum Beispiel Ethylacetat, Tetrahydrofuran (THF) oder Methylenechlorid eingesetzt werden, insbesondere auch im Gemisch mit anderen Lösungsmitteln. Ganz besonders bevorzugt wird die Kupplung in DMF oder NMP durchgeführt, die beide ausgezeichnete Kupplungsergebnisse geben und zu
- 10 isolierten Ausbeuten an Verbindung der Formel I von ca. 85 - 95 % d. Th. führen (nach zweifacher Fällung des Produkts). Speziell bevorzugt wird die Kupplung in DMF durchgeführt, da dieses leichter aus dem Produkt zu entfernen ist. Bevorzugt wird die Kupplung bei Temperaturen von ca. 0 bis ca 30 °C, besonders bevorzugt bei ca. 0 bis ca. 25 °C durchgeführt, zu Beispiel, in dem man das
- 15 Reaktionsgemisch erst bei ca. 10 °C röhrt und dann auf Raumtemperatur kommen lässt. Wenn man in der bevorzugten Ausführungsform des Kupplungsschrittes die Verbindung der Formel III in der Form des Zwitterions der Formel IIIa mit dem Dikationsalz der Formel IX umsetzt, so liegt im allgemeinen während des gesamten Kupplungsverlaufes ein günstiger pH-Wert (von ca. 3.3 bis 4.2, wenn X in der
- 20 Verbindung der Formel IX für Tosylat steht) vor, ohne dass eine zusätzliche Base zugegeben werden muß. Gegebenenfalls kann durch Zusatz einer Base wie einem tertiären Amin der pH-Wert entsprechend eingestellt werden. Wenn in die Kupplung sowohl die Verbindung der Formel III als auch die Verbindung der Formel IV in Form von Salzen mit einer Säure HX eingesetzt werden, ist bei der Peptidkupplung
- 25 die Zugabe von mindestens einem Äquivalent einer Base, zum Beispiel einem tertiären Amin wie Triethylamin oder bevorzugt N-Ethyldiisopropylamin, erforderlich.

In der bevorzugten Ausführungsform des Kupplungsschritts, in der als Aktivierungs-Agenz ein Carbodiimid zusammen mit einem N-Hydroxybenzotriazin- oder N-
 30 Hydroxybenzotriazol-Reagenz wie zum Beispiel HOObt eingesetzt wird, kann dieses Reagenz im Unterschluß oder nur in katalytischen Mengen vorliegen, da bei der Umsetzung der Verbindung der Formel IV mit dem intermediär gebildeten

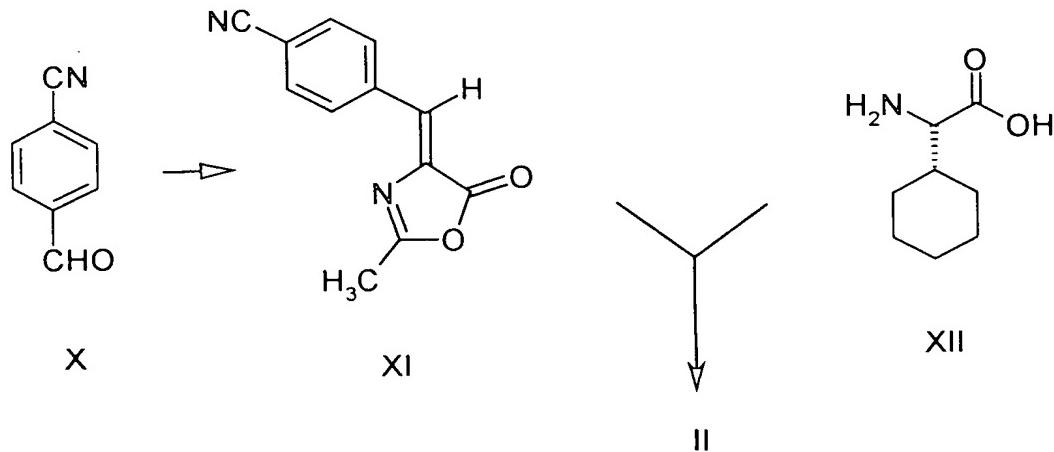
Aktivester aus der Verbindung der Formel III und dem N-Hydroxy-Reagenz das N-Hydroxy-Reagenz regeneriert wird. Zum Beispiel wird bei Durchführung der Kupplung mit DCC/HOObt das HOObt bevorzugt in einer Menge von ca. 0.15 bis ca. 1 mol pro mol der Verbindung der Formel III eingesetzt, besonders bevorzugt in 5 einer Menge von ca. 0.2 bis ca. 0.3 mol, zum Beispiel ca. 0.25 mol, pro mol der Verbindung der Formel III. Das Carbodiimid wird bevorzugt in einem kleinen Überschuss eingesetzt, zum Beispiel bei der Durchführung der Kupplung mit DCC/HOObt bevorzugt in einer Menge von ca. 1.1 bis ca. 1.4 mol pro mol der Verbindung der Formel III, besonders bevorzugt in einer Menge von ca. 1.2 bis ca. 10 1.3 mol, zum Beispiel 1.25 mol, pro mol der Verbindung der Formel III. Die Reihenfolge des Zusammengabens der Reaktionspartner ist variabel. Bevorzugt werden die Verbindungen der Formeln III und IV oder deren Salze, eine gegebenenfalls zugesetzte Base und das N-Hydroxy-Reagenz vorgelegt und das Carbodiimid wird zudosiert, zum Beispiel in Form einer Lösung in einem 15 Lösungsmittel wie DMF oder NMP über einen Zeitraum von mehreren Stunden, zum Beispiel ca. 5 bis ca. 10 Stunden. Bei dieser Vorgehensweise ist die Kupplung bei einer Reaktionstemperatur von ca. 10 °C und Nachröhren bei Raumtemperatur im allgemeinen rasch beendet, erfolgt nahezu quantitativ und liefert das Produkt in hoher Reinheit.

20

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch vorteilhaft zunächst filtriert und dann durch Zusatz eines geeigneten organischen Lösungsmittels das Produkt ausgefällt. Bei Durchführung der Kupplung in DMF oder NMP erfolgt die Fällung bevorzugt mit einem Überschuss eines niederen Ketons wie Aceton oder Methylethylketon, 25 besonders bevorzugt wird die DMF-Lösung oder NMP-Lösung in einen Überschuss Aceton oder Methylethylketon eingetropft oder eingepumpt. Das ausgefällte Produkt wird durch Filtration oder Zentrifugation isoliert, gewaschen und, soweit zur Erhöhung der Reinheit gewünscht, ein zweites Mal oder auch ein drittes Mal in analoger Weise umgefällt (zum Beispiel durch Lösen in DMF und Ausfällen durch 30 Einpumpen der Lösung in Aceton oder Methylethylketon). Nebenprodukte verbleiben bei dieser Vorgehensweise weitgehend in der Lösung, und nach zweifacher Fällung wird zum Beispiel die Verbindung der Formel Ia (Ditosylat) mit

einer Ausbeute von ca. 91 % und einem Gehalt von ca. 97 % erhalten (plus ca. 2.4 % Diastereomer).

Die Herstellung der Ausgangsverbindungen der Formeln II und IV oder deren
 5 Salzen, die in dem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden, kann beispielsweise nach den im folgenden beschriebenen Verfahren erfolgen. In einer bevorzugten Form des oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens werden die eingesetzte Ausgangsverbindung der Formel II und/oder die eingesetzte Ausgangsverbindung der Formel IV oder deren Salz nach den im
 10 folgenden beschriebenen Verfahren oder teilweise nach den im folgenden beschriebenen Verfahren hergestellt.



15 Die Verbindung der Formel II ist durch Umsetzung des Azlactons der Formel XI mit (S)-Cyclohexylglycin (Formel XII) erhältlich. Das Azlacton der Formel XI, das im wesentlichen als Z-Isomer vorliegt, entsteht unter Standardbedingungen für die Erlenmeyersche Azlacton-Synthese aus 4-Formylbenzonitril (Formel X) und N-Acetylglycin, zum Beispiel durch Erhitzen mit Natriumacetat und Acetanhydrid in
 20 einem Lösungsmittel, bevorzugt durch Erhitzen in Aceton unter Rückfluß. Die Umsetzung der Verbindungen der Formeln XI und XII zum Dehydronipeptid der Formel II erfolgt bevorzugt in alkalischer Lösung, zum Beispiel unter Zusatz von einem Äquivalent (bezogen auf das Cyclohexylglycin) einer Base wie Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid, in einem Gemisch aus Wasser und einem

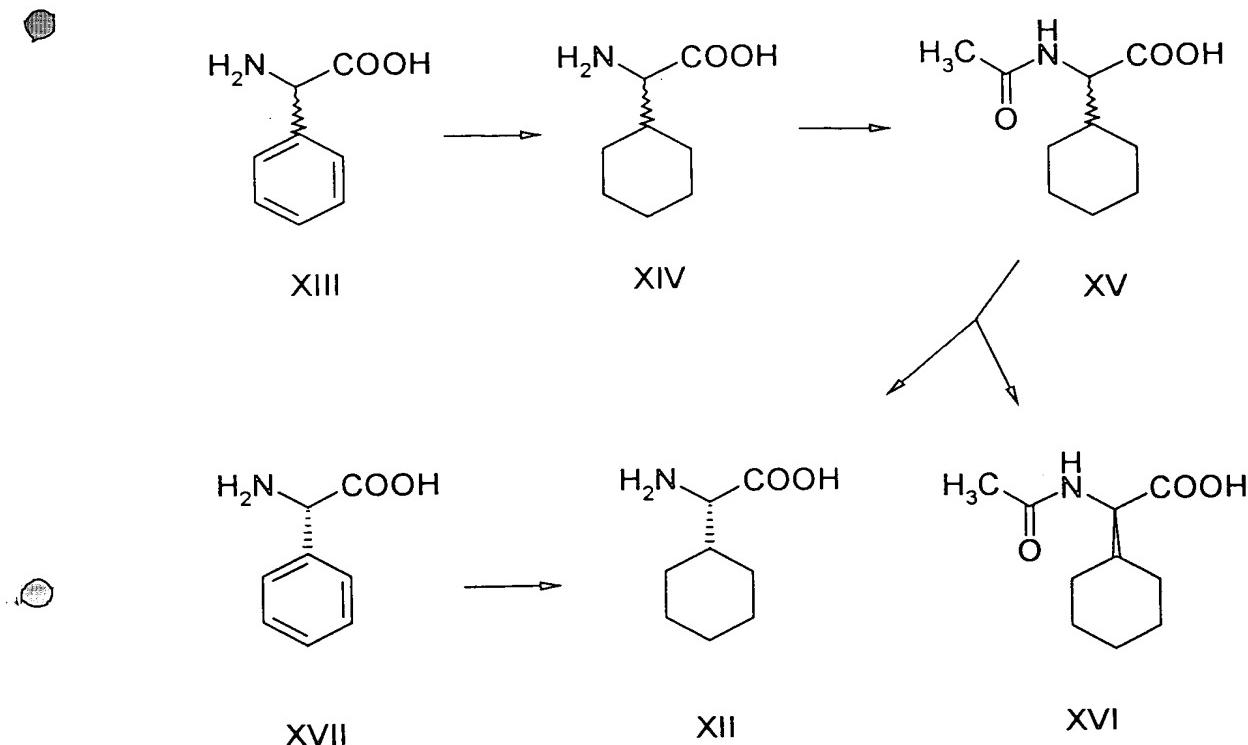
wassermischbaren organischen Lösungsmittel, zum Beispiel einem Keton wie Aceton oder einem Ether, besonders bevorzugt in einem Gemisch aus Aceton und Wasser, bei Temperaturen von ca. 30 bis ca. 50 °C, zum Beispiel bei 40 °C. Zur Isolierung des Produkts wird das Reaktionsgemisch angesäuert, zum Beispiel mit

- 5 Salzsäure auf einen pH-Wert von ca. 2.3, mit Wasser verdünnt und der Niederschlag abfiltriert oder zentrifugiert. Bei dieser Vorgehensweise liegt die erhaltene Verbindung der Formel II überwiegend als Z-Isomer vor, der Anteil an E-Isomer ist < 2 %. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Verbindungen der Formeln II und XI und Salze der Verbindung der Formel II per se, 10 insbesondere die Z-Formen, die beschriebenen Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung als Zwischenprodukte, insbesondere als Zwischenprodukte für Arzneimittelwirkstoffe. Als Salze der Verbindung der Formel II seien zum Beispiel Alkalimetall- und Erdalkalimetallsalze wie das Natriumsalz oder das Kaliumsalz genannt.

15

- Das benötigte optisch reine (S)-Cyclohexylglycin (Formel XII) wird vorteilhaft auf einem der folgenden drei Wege hergestellt. Auf einem Weg geht man von racemischem Phenylglycin (Formel XIII) aus, das durch Aromatenhydrierung unter Standardbedingungen in racemisches Cyclohexylglycin (Formel XIV) umgewandelt 20 wird, zum Beispiel durch Hydrierung in Gegenwart eines Edelmetallkatalysators wie Rhodium auf Kohle in Salzsäure bei ca. 80 bis ca. 120 °C, zum Beispiel bei ca. 100 °C, und bei einem Wasserstoffdruck von ca. 10 bis ca. 30 bar. Das racemische Cyclohexylglycin wird dann unter Standardbedingungen an der Aminogruppe acetyliert, zum Beispiel mit Acetanhydrid in Gegenwart einer Base wie 25 Natriumhydroxid in Wasser bei einer Temperatur von ca. 0 bis ca. 30 °C und einem pH-Wert von mindestens 11. Das racemische N-Acetyl-cyclohexylglycin (Formel XV) wird dann einer enzymatischen Racematspaltung mit einer Acylase (L-spezifische Aminoacylase, E.C.3.5.1.14) zu optisch reinem (S)-Cyclohexylglycin (Formel XII) und N-Acetyl-cyclohexylglycin mit einem hohem Überschuss des (R)-30 Antipoden (Formel XVI) unterworfen (siehe zum Beispiel K. Drauz et al., Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, VCH, Weinheim, 1995; M. A. Verkhovskaja et al., Russ. Chem. Rev. 60 (1991) 1163; H. K. Chenault et al., J. Am. Chem. Soc. 111

(1989) 6354). Die selektive enzymatische Entacetylierung des (S)-N-Acetyl-cyclohexylglycins in dem (RS)-Gemisch kann zum Beispiel mit der Acylase "Amano" 30.000 in Gegenwart von Cobalt(II)-chlorid in Wasser bei einem pH-Wert von ca. 7.8 und einer Temperatur von ca. 38 bis 40 °C durchgeführt werden. Das ausfallende Cyclohexylglycin ist nahezu enantiomerenreines (S)-Isomer. Das im Filtrat verbleibende (R)-N-Acetyl-cyclohexylglycin kann nach Racemisierung, zum Beispiel durch Erhitzen mit Essigsäure und Acetanhydrid auf ca. 115 °C, erneut in die enzymatische Entacetylierung eingesetzt werden, so dass letztlich fast das gesamte racemische N-Acetyl-cyclohexylglycin in optisch reines (S)-Cyclohexylglycin umgewandelt wird.

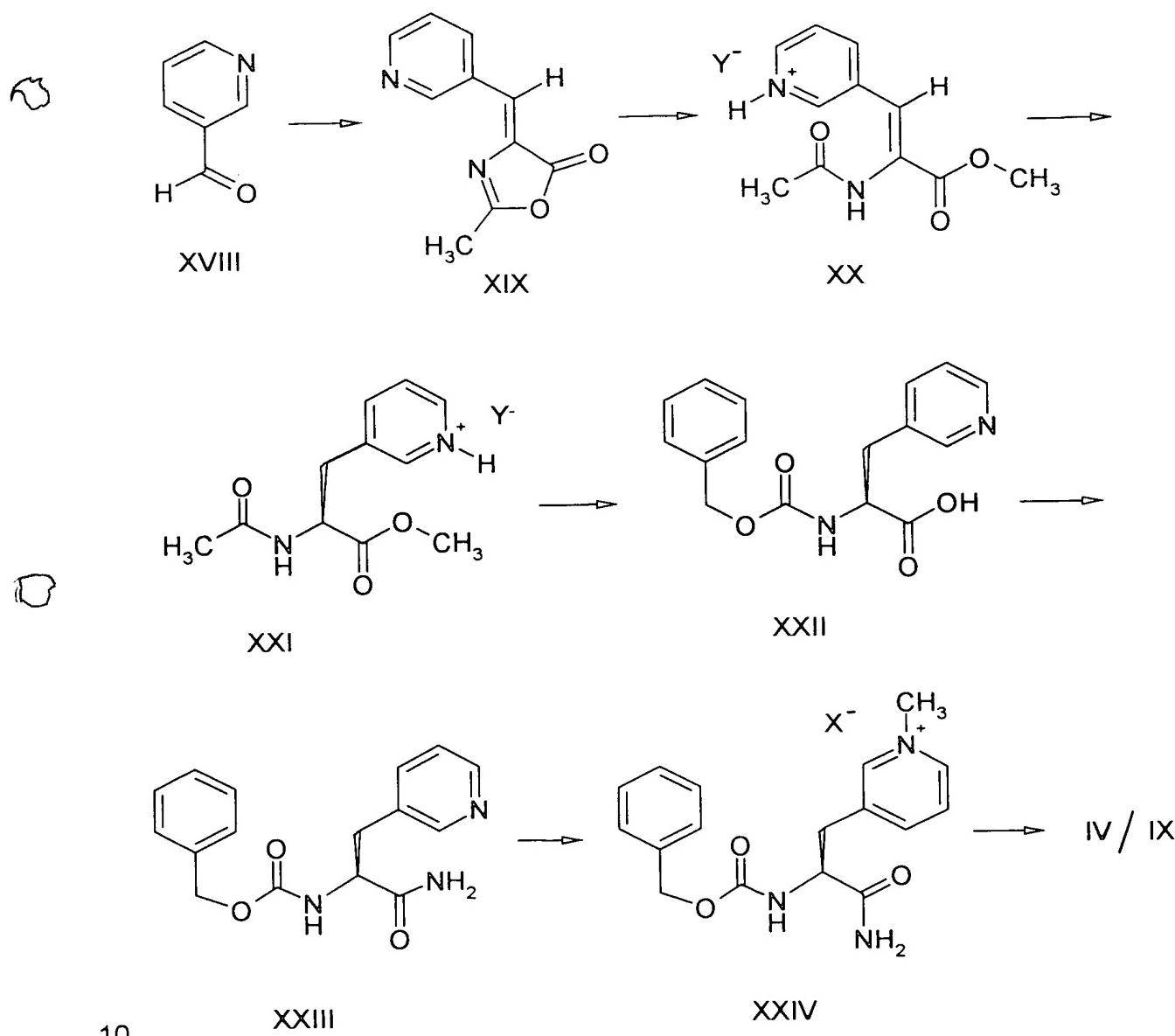


Eine zweite Herstellungsmöglichkeit für (S)-Cyclohexylglycin besteht darin, dass man racemisches N-Acetyl-cyclohexylglycin (Formel XV) einstufig mittels Palladium-katalysierter Amidocarbonylierung aus Cyclohexanecarbaldehyd, Kohlenmonoxid und Acetamid herstellt und anschließend der beschriebenen Racematspaltung mit einer Acylase unterwirft (siehe M. Beller et al., Chem. Eur. J. 4 (1998) 935).

Beim dritten Herstellungsverfahren für (S)-Cyclohexylglycin (Formel XII) wird die Phenylgruppe in enantiomerenreinem (S)-Phenylglycin (Formel XVII) unter racemisierungsfreien Bedingungen zur Cyclohexylgruppe hydriert. Als Katalysator kann wiederum ein Edelmetallkatalysator wie zum Beispiel Rhodium auf Kohle verwendet werden. Die Hydrierung erfolgt bevorzugt in einem sauren Medium, zum Beispiel einer Carbonsäure wie Eisessig, besonders bevorzugt in einer starken Säure wie zum Beispiel 2 N Salzsäure oder Schwefelsäure. In einer derartigen starken Säure erfolgt die Hydrierung bei einer Temperatur von ca. 60 bis 80 °C und einem Wasserstoffdruck von zum Beispiel ca. 20 bar rasch und ohne wesentliche Racemisierung. Das erhaltene Produkt hat eine ähnliche Qualität wie das Produkt, das nach dem oben beschriebenen Verfahren aus racemischen Phenylglycin erhalten wird. Zwar ist die Ausgangsverbindung (S)-Phenylglycin teurer als die Ausgangsverbindung (RS)-Phenylglycin, aufgrund der geringeren Herstellungskosten ist das vom (S)-Phenylglycin ausgehende Verfahren aber vorteilhafter.

Die Herstellung der enantiomerenreinen Ausgangsverbindung der Formel IV bzw. ihres Salzes der Formel IX erfolgt vorteilhaft ausgehend von Pyridin-3-carbaldehyd (Formel XVIII), der unter ähnlichen Bedingungen wie oben für die Überführung der Verbindung der Formel X in die Verbindung der Formel XI angegeben in das Azlacton der Formel XIX überführt werden kann, zum Beispiel durch Erhitzen mit N-Acetylglycin und Acetanhydrid in Aceton. Das Azlacton der Formel XIX kann mit Wasser zum N-Acetyl-dehydro-pyridylalanin, das heißt zur Carbonsäure, oder mit einem niederen Alkohol, zum Beispiel einem (C_1-C_3)-Alkanol wie Methanol oder Ethanol, zu einem Ester davon, bevorzugt mit Methanol zum Methylester (vergleiche Formel XX), solvolysiert werden. Da die anschließende asymmetrische Hydrierung besonders vorteilhaft in einem Alkohol unter sauren Bedingungen durchgeführt wird und unter diesen Bedingungen die Carbonsäurefunktion weitgehend oder vollständig in den Ester überführt wird, und da die Solvolyse des Azlactons der Formel XIX mit Alkoholen glatter verläuft als mit Wasser, wird die Verbindung der Formel XIX bevorzugt mit einem niederen Alkohol solvolysiert,

besonders bevorzugt mit Methanol. Die Alkoholyse wird bevorzugt in Gegenwart einer schwachen Base, zum Beispiel eines tertiären Amins wie Triethylamin, bei Temperaturen von ca. 50 bis ca. 65 °C durchgeführt. Der Methylester wird bevorzugt in Form eines Säureadditionssalzes mit einer starken Säure isoliert, das 5 heißt in Form einer Verbindung der Formel XX, in der das Anion Y hier für das Anion einer starken Säure steht, zum Beispiel Tetrafluoroborat oder Tosylat. Besonders bevorzugt wird das Methanolyseprodukt des Azlactons der Formel XIX durch Zusatz von Tetrafluoroborsäure, zum Beispiel einer wässrigen



Tetrafluoroborsäurelösung, bis zu einem pH-Wert von ca. 1.5 bis ca. 2, zum Beispiel ca. 1.9, als Tetrafluoroborat-Salz ausgefällt und nach Vervollständigen der Fällung durch Zusatz eines unpolaren Lösungsmittels, zum Beispiel eines Ethers wie Methyl-tert-butylether, abfiltriert oder zentrifugiert. Die Verbindung der Formel XX mit $Y = BF_4$ wird dabei in hoher Ausbeute (90 %) und sehr hoher Reinheit (> 99.5 %) erhalten.

- Als nächster Schritt erfolgt eine asymmetrische katalytische Hydrierung des Dehydropyridylalaninderivats der Formel XX zum optisch aktiven Aminosäurederivat der Formel XXI. Wie erwähnt wird zur Erzielung einer hohen Ausbeute und einer kurzen Reaktionszeit diese Hydrierung bevorzugt unter sauren Bedingungen durchgeführt, zum Beispiel in Essigsäure, besonders bevorzugt in Gegenwart einer starken Säure, zum Beispiel Toluol-4-sulfonsäure oder
- Tetrafluoroborsäure, die in mindestens der stöchiometrischen Menge, zum Beispiel der 1- bis 2-fachen molaren Menge eingesetzt wird und durch die die Pyridingruppe vollständig in das Pyridiniumsalz überführt wird. Bevorzugt wird in die Hydrierung ein Pyridiniumsalz der Formel XX eingesetzt und gegebenenfalls noch zusätzliche Säure zugesetzt. Besonders bevorzugt wird die Hydrierung des Pyridiniumsalzes der Formel XX, insbesondere des Salzes mit $Y = BF_4$, in einem niederen Alkohol, speziell Methanol, in Gegenwart von ca. 15 mol-Prozent einer starken Säure durchgeführt. Als Säure, in deren Gegenwart die Hydrierung des Salzes der Formel XX erfolgt, sind Tetrafluoroborsäure und Toluol-4-sulfonsäure bevorzugt, insbesondere Tetrafluoroborsäure, die in Form einer wässrigen Lösung eingesetzt werden kann.

Hinsichtlich des Katalysators für die asymmetrische Hydrierung der Verbindungen der Formel XX zu denen der Formel XXI gelten die obigen Erläuterungen zu den Katalysatoren für Hydrierung der Verbindung der Formel II zu der der Formel VI entsprechend. So kann auch die stereokontrollierte Hydrierung der C=C-Doppelbindung in der Verbindung der Formel XX mit selektiven Heterogenkatalysatoren oder mit chiralen Übergangsmetallkomplexen erfolgen.

Bevorzugt wird sie mit chiralen Metallkomplexen von Rhodium(I) oder Ruthenium(II), insbesondere von Rhodium(I), durchgeführt. Der Übergangsmetallkatalysator kann in isolierter Form eingesetzt werden oder *in situ* im Hydriermedium aus einem chiralen Liganden und einem Präkatalysator, zum Beispiel einem Rhodiumsalz wie $[\text{Rh}(\text{COD})\text{Cl}]_2$, erzeugt werden. Bevorzugt wird der Katalysator *in situ* hergestellt. Als chiraler Ligand in dem Übergangsmetallkomplex können wiederum zahlreiche verschiedenartige Verbindungen dienen. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird für die asymmetrische Hydrierung der Verbindungen der Formel XX zu den Verbindungen der Formel XXI ein Rhodium(I)-Komplex mit einem chiralen Phosphin als Liganden eingesetzt, besonders bevorzugt ein Rh(I)-(+)-Phenyl-CAPP-Katalysator, das heißt ein Rhodium(I)-Katalysator, der als chiralen Liganden (+)-(2R,4R)-1-Phenylaminocarbonyl-4-diphenylphosphino-2-(diphenylphosphinomethyl)-pyrrolidin enthält (im molaren Verhältnis Rhodium zu Ligand = 1 : 1). Als Ligand in Katalysatorkomplexen können aber beispielsweise auch das oben erwähnte (+)-BPPM oder das Aminophosphin-phosphinit (+)-PPP (= (+)-Proraphos, siehe C. Döbler et al., Tetrahedron: Asymmetry 7 (1996) 117) eingesetzt werden. Weitere Liganden für geeignete katalytisch aktive Übergangsmetallkomplexe sind zum Beispiel in I. Ojima, Catalytic Asymmetric Synthesis, Seite 445 - 447, VCH, New York 1993, angegeben.

Bevorzugt wird die Hydrierung der Verbindung der Formel XX bei Temperaturen von ca. 20 bis ca. 60 °C durchgeführt, besonders bevorzugt zwischen ca. 30 und ca. 50 °C, zum Beispiel bei ca. 40 °C. Der eingestellte Wasserstoffdruck hängt wiederum von der verwendeten Apparatur ab, bevorzugt wird ein Wasserstoffdruck von ca. 0.2 bis ca. 20 bar, besonders bevorzugt von ca. 0.2 bis ca. 10 bar, speziell bevorzugt von ca. 0.5 bis ca. 1 bar, eingestellt, zum Beispiel von ca. 0.8 bar. Insbesondere bei Einsatz eines Rh(I)-Phenyl-CAPP-Katalysators wird zur Steigerung der Enantioselektivität die Hydrierung bevorzugt bei einem relativ niedrigen Wasserstoffdruck durchgeführt. Wie oben für die Hydrierung der Verbindung der Formel II erläutert, wird auch hier zur Steigerung der Effizienz der Hydrierung unter möglichst weitgehendem Sauerstoffausschluß und unter

möglichst intensiver Durchmischung gearbeitet. Die Isolierung des Hydrierungsprodukts der Formel XXI, insbesondere im Falle des Tetrafluoroboratsalzes, erfolgt bevorzugt durch Kristallisation, zum Beispiel aus einem Alkohol wie Isopropanol. Die isolierte Ausbeute beträgt ca. 86 bis ca. 95 %, 5 die Enantiomerenreinheit je nach den angewandten Bedingungen ca. 70 % bis ca. 95 % e.e. an (S)-Isomer. Bei der Hydrierung der Verbindungen der Formel XX zu denen der Formel XXI können sehr hohe Substrat/Katalysator-Verhältnisse von ca. 5000:1 bis ca. 10000:1, zum Beispiel ca. 8000:1, angewandt werden.

- 10 Im folgenden Schritt wird in den Verbindungen der Formel XXI die Methylestergruppe zur Carbonsäuregruppe verseift, die Acetylgruppe an der Aminogruppe abgespalten und die Aminogruppe in geeigneter Weise geschützt, so dass sie bei der Bildung der Carbonsäureamid-Funktion nicht zu Nebenreaktionen Anlass gibt. Die Abspaltung der Acetylgruppe und die Hydrolyse des Methylesters 15 zur freien Carbonsäure können gleichzeitig durch Behandeln mit einer Säure, zum Beispiel mit wässriger Salzsäure wie 1 N Salzsäure oder 4 N Salzsäure bei Temperaturen von zum Beispiel ca. 60 bis ca. 85 °C oder von ca. 85 bis ca. 90 °C, erfolgen. Zur Erleichterung der Produktisolierung aus dem wässrigen Reaktionsgemisch wird dann zweckmäßigerweise gleich die freie Aminogruppe 20 eine leicht spaltbare Acylaminogruppe, zum Beispiel in die Benzyloxycarbonylaminogruppe, überführt. Die Einführung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe (= Z-Gruppe) erfolgt bevorzugt mit N-Benzyloxycarbonyloxy-succinimid ((= Z-OSu) in Wasser/THF als Lösungsmittel im schwach alkalischen Bereich, besonders bevorzugt bei einem pH-Wert von ca. 8.0 bis ca. 8.5. Nach 25 beendeter Reaktion wird das organische Lösungsmittel abdestilliert, ein schwach saurer pH-Wert eingestellt, bevorzugt ein pH-Wert von ca. 5, und die ausgefallene Verbindung der Formel XXII abfiltriert oder zentrifugiert. Gegebenenfalls kann vor der Herstellung des Amids der Formel XXIII die Reinheit der Verbindung der Formel XXII noch durch Umkristallisation, um Beispiel aus Wasser, gesteigert werden.

30

Wenn die Enantiomerenreinheit der Verbindungen der Formel XXI bzw. der daraus nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren erhältlichen Verbindung der Formel

XXII nicht ausreichend ist, ist es vorteilhaft, die Abspaltung der Acetylgruppe von der Aminogruppe in der Verbindung der Formel XXI nicht mit Salzsäure, sondern enzymatisch und somit enantioselektiv durchzuführen. Bevorzugt erfolgt die enzymatische Entacetylierung analog der oben beschriebenen enzymatischen

- 5 Entacetylierung von (RS)-N-Acetyl-cyclohexylglycin unter Verwendung der Acylase "Amano" 30.000. In einer besonders bevorzugten Vorgehensweise wird zunächst das nach der Hydrierung isolierte Salz der Formel XXI in Wasser gelöst und nach Zusatz einer Base, zum Beispiel Natriumhydroxid, im alkalischen Bereich, zum Beispiel bei einem pH-Wert von ca. 10 bis ca. 11, zur Verseifung des Methylesters 10 gerührt. Nach Zugabe von Cobalt(II)-chlorid als Co-Katalysator wird bei einem pH-Wert von ca. 7.8 bis 7.9 und einer Temperatur von ca. 38 bis 40 °C die Acylase zugesetzt, zum Beispiel in einer Menge von ca. 5 bis 6 g pro kg der Verbindung der Formel XXI, und gerührt, bis das (S)-Isomer entacetyliert ist. Für die Überführung des entacetylierten (S)-Isomers in die geschützte N-
- 15 Benzyloxycarbonylaminoverbindung wird anschließend bevorzugt, wie oben erläutert, zum Reaktionsgemisch ein wassermischbares Lösungsmittel wie THF zugegeben, bei einem pH-Wert von ca. 8.0 bis ca. 8.5 mit Z-OSu umgesetzt und nach Abdestillieren des organischen Lösungsmittels und Ansäuern auf einen pH-Wert von ca. 5 das ausgefallene enantiomerenreine Produkt der Formel XXII 20 isoliert.

 Die Überführung der Z-geschützten Aminosäure der Formel XXII in das Z-

- geschützte Aminosäureamid der Formel XXIII kann nach den üblichen, dem Fachmann bekannten Methoden für derartige Umwandlungen erfolgen. Nach einer 25 bevorzugten Methode wird die Säure der Formel XXII aktiviert, indem sie mit einem Chlorameisensäurealkylester, besonders bevorzugt mit Chlorameisensäureisobutylester, in das gemischtes Anhydrid überführt wird. Diese Reaktion wird bevorzugt in Gegenwart eines tertiären Amins, zum Beispiel N-Ethyldiisopropylamin, in einem Ether wie THF als Lösungsmittel bei Temperaturen 30 von ca. -10 bis ca. 0 °C, bevorzugt ca. -10 bis ca. -5 °C, durchgeführt. In die Lösung des gemischten Anhydrids wird dann bei einer Temperatur von ca. -10 bis ca. 0 °C, bevorzugt ca. -10 bis ca. -5 °C, Ammoniak eingeleitet. Nach üblicher

Aufarbeitung und Kristallisation aus einem Lösungsmittel wie zum Beispiel Ethylacetat wird die Verbindung der Formel XXIII in einer Ausbeute von ca. 87 % mit einer chemischen Reinheit und Enantiomerenreinheit von jeweils nahezu 100 % erhalten.

5

- Die Methylierung des Pyridin-Stickstoffatoms in der Verbindung der Formel XXIII unter Bildung des Pyridiniumsalzes der Formel XXIV gelingt glatt mit zahlreichen Methylierungsmitteln, zum Beispiel Methyliodid, Methylbromid, Methylchlorid oder Toluol-4-sulfonsäuremethylester, in einer Reihe von Lösungsmitteln, zum Beispiel
- 10 Alkoholen wie Isopropanol, Amiden wie DMF, N,N,N',N'-Tetramethylharnstoff, Ketonen wie Aceton oder Ethern wie THF, bevorzugt bei Temperaturen von ca. 40 bis ca. 60 °C. Zum Beispiel wird bei der Umsetzung der Verbindung der Formel XXIII mit Methylchlorid in DMF bei 45 °C die Verbindung der Formel XXIV mit X = Cl in quantitativer Ausbeute und einer Reinheit von ca. 98.4 % erhalten. Bevorzugt
- 15 wird bei der Durchführung der Methylierung im technischen Maßstab ein weniger flüchtiges Methylierungsmittel eingesetzt. Da ein zusätzlicher Anionenaustausch, etwa durch Ionenaustausch-Chromatographie, möglichst vermieden werden soll, ist ein Gesichtspunkt bei der Auswahl des Methylierungsmittels auch der Einfluß des aus dem Methylierungsmittel stammenden Anions X, das in den Verbindungen der
- 20 Formeln IV, IX und I enthalten ist, auf die Eigenschaften dieser Verbindungen, zum Beispiel auf die Löslichkeit der Verbindung der Formel IV oder eines Salzes davon, die in der Kupplungsreaktion der Verbindungen der Formeln III und IV von Bedeutung ist, oder auf die Löslichkeiten, die Fällbarkeiten und die physiologische Verträglichkeit der Verbindung der Formel I. Insgesamt gesehen erweisen sich die
- 25 Iodide und Toluol-4-sulfonate auf Grund ihrer Eigenschaften als besonders günstig, und bevorzugte Methylierungsmittel sind daher Methyliodid und Toluol-4-sulfonsäuremethylester (= Methyltosylat). Speziell die Toluol-4-sulfonate zeichnen sich durch eine gute Isolierbarkeit und hohe Löslichkeit und hohe Peptidkupplungsgeschwindigkeit im Fall der Verbindung der Formel IV bzw. des
- 30 Toluol-4-sulfonsäuresalzes davon und insbesondere durch eine überraschend gute Fällbarkeit, Reinheit und Ausbeute im Fall der Verbindung der Formel I aus, und ein besonders bevorzugtes Methylierungsmittel für die Überführung der Verbindung der

Formel XXIII in die Verbindung der Formel XXIV ist daher Toluol-4-sulfonsäuremethylester.

Die Methylierung der Verbindung der Formel XXIII mit Toluol-4-

- 5 sulfonsäuremethylester erfolgt bevorzugt in einem niederen Alkohol als Lösungsmittel, zum Beispiel in Isopropanol, bei Temperaturen von ca. 40 bis ca. 60 °C, zum Beispiel bei ca. 50 °C. Der Toluol-4-sulfonsäuremethylester wird bevorzugt in einem Überschuss, zum Beispiel in der 1- bis ca. 1.2-fachen molaren Menge bezogen auf die Verbindung der Formel XXIII, eingesetzt. Die Methylierung 10 der Verbindung der Formel XXIII und die anschließende Abspaltung der Benzylloxycarbonyl-Schutzgruppe in der Verbindung der Formel XXIV durch Hydrogenolyse können in separaten Schritten durchgeführt werden. Bevorzugt werden die Methylierung und die Hydrogenolyse in einer Eintopfreaktion ohne Abspaltung der Benzylschutzgruppe. Die Hydrogenolyse kann durch Reduktion 15 des Salzes aus dem Reaktionsmedium der Methylierung gegebenenfalls ausgefallene Verbindung der Formel XXIV in Lösung gebracht, zum Beispiel durch Zusatz von Wasser zum Reaktionsgemisch der Methylierung, und dann unter üblichen Bedingungen hydriert, zum Beispiel in Gegenwart eines üblichen Edelmetallkatalysators wie Palladium auf Kohle bei Temperaturen von ca. 20 bis 20 ca. 40 °C, bevorzugt ca. 20 bis ca. 30 °C, und bei einem Wasserstoffdruck von ca. 1 bis ca. 20 bar, bevorzugt bei ca. 1 bis ca. 5 bar, besonders bevorzugt bei ca. 1 bar, das heißt ohne Wasserstoff-Überdruck. Das Monokationsalz aus dem 3-((S)-2-Amino-2-carbamoyl-ethyl)-1-methylpyridinium-Kation (mit freier Aminogruppe NH₂ in der 2-Position) und einem Anion X, zum Beispiel Tosylat, Iodid oder Chlorid, als 25 Gegenion, das heißt die Verbindung der Formel IV, kann als solches isoliert werden. Bevorzugt wird das erhaltene Pyridinioalaninamid in Form eines Salzes mit der Säure HX, das heißt in Form des Dikationsalzes der Formel IX, isoliert und zu diesem Zweck dem Reaktionsgemisch der Hydrogenolyse ca. 1 Äquivalent der Säure HX zugesetzt, im Falle des Tosylates also ca. 1 Äquivalent Toluol-4- 30 sulfonsäure. Nach Abfiltrieren des Hydrierkatalysators kann das Produkt dann zum Beispiel durch Einengen und Kristallisation des Rückstandes, zum Beispiel aus einem Alkohol wie Isopropanol, isoliert werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Verbindungen der Formel IV, in denen X⁻ für ein Anion oder Anionäquivalent, insbesondere für ein physiologisch verträgliches Anion, zum Beispiel Chlorid, Bromid, Iodid oder Toluol-4-sulfonat, 5 steht, und deren Salze mit der Säure HX (= Dikationsalze der Formel IX), per se, das beschriebene Verfahren zu ihrer Herstellung und Verfahren, in denen einer oder mehrere der beschriebenen Schritte durchgeführt werden, und ihre Verwendung als Zwischenprodukte, insbesondere als Zwischenprodukte für Arzneimittelwirkstoffe, sowie die Verbindungen der Formeln XX, XXI, XXII und XXIV 10 per se.

Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung der vorliegenden Erfindung. Die Erfindung umfaßt aber ebenso Modifikationen der oben und im folgenden beschriebenen Ausführungsformen, zum Beispiel Verfahren, in denen Schritte zu 15 Eintopfverfahren zusammengefaßt werden oder umgekehrt, Schritte in anderer Reihenfolge durchgeführt werden oder ähnliche Reagenzien oder Lösungsmittel eingesetzt werden oder Mengenverhältnisse oder Aufarbeitungsmethoden abgewandelt werden.

20 Beispiele

Beispiel 1: 4-(2-Methyl-5-oxo-oxazol-4-ylidenmethyl)-benzonitril

Zu 4-Formylbenzonitril (15.0 kg, 114.5 mol), N-Acetylglycin (19.2 kg, 162.4 mol) 25 und wasserfreiem Natriumacetat (9.4 kg, 114.5 mol) wurde Aceton (80.0 l) zulaufen gelassen, dann wurde unter Rühren Essigsäureanhydrid (35.0 l, 370.5 mol) zulaufen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h unter Rückfluss gerührt. Die entstandene dünnflüssige, gelbe Suspension wurde auf 50 °C gekühlt und Eiswasser (200 l) unter Rühren und Kühlung so schnell wie möglich zulaufen 30 gelassen. Es wurde noch 1 h bei 20 °C nachgerührt. Zur Isolierung des Produktes wurde die gelbe Suspension auf eine Zentrifuge gedrückt und mit entsalztem Wasser (75 l), Isopropanol (40 l) und Methyl-tert-butylether (75 l) gewaschen. Das

Produkt wurde im Vakuum bei 40 °C getrocknet. Ausbeute: 18.17 kg (85.7 mol, 75.2 % d. Th.). Schmp.: 192 - 193 °C; MS (DCI): m/z = 213 [M+H⁺]; ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 2.42 (s, 3H), 7.30 (s, 1H), 7.96 (d, 2H), 8.33 (d, 2H).

5 Beispiel 2: (R,S)-Cyclohexylglycin

Unter Stickstoff wurde (R,S)-Phenylglycin (10.0 kg, 66.2 mol) unter Rühren zu Wasser (78.5 l) und Salzsäure (30 %ig, 21.5 l) zugegeben. Anschließend wurde Rhodium auf Kohle (209.6 g, G 101 S/W 5 % wassernass, Degussa AG) unter 10 Rühren und Stickstoff zugegeben. Es wurde ein Wasserstoffdruck von 18 bar eingestellt, auf eine Innentemperatur von 100 °C erwärmt und 72 h gerührt. Dann wurde auf eine Innentemperatur von 50 °C abgekühlt. Zur DC-Kontrolle (Butanol/Eisessig/Wasser 2/1/1, R_f [Phenylglycin] = 0.60, R_f [Cyclohexylglycin] = 0.68) wurde eine Probe entnommen. Nach vollständigem Umsatz wurde der 15 Katalysator bei 50 °C abfiltriert und der pH-wert des Filtrats mit Natronlauge (konz., ca. 15 l) wurde bei 20 °C auf 4 eingestellt. Man ließ 30 min röhren, filtrierte das ausgefallene Produkt ab, wusch zweimal mit Wasser (je 35 l) und trocknete bei 50 °C im Vakuum. Ausbeute: 9.7 kg (93 % d. Th.). Schmp.: > 300 °C; MS (DCI): m/z (%) = 158 ([M⁺ + H], 100); ¹H-NMR (200 MHz, Trifluoressigsäure(TFA)): δ = 1.1 20 - 1.6 (m, 5H), 1.7 - 2.1 (m, 5H), 2.1 - 2.3 (m, 1H), 4.3 (d, J = 4 Hz, 1H), 11.6 (s, 1 H); IR (KBr): ν = 2927.7, 1583.9, 1508.8 cm⁻¹.

Beispiel 3: (R,S)-N-Acetyl-cyclohexylglycin

25 Zu Natronlauge (konz., 30.2 l) in Wasser (134 l) wurde bei Raumtemperatur (R,S)- Cyclohexylglycin (9.41 kg, 61.7 mol) wurden unter Rühren zugegeben. Es wurde auf eine Innentemperatur von 5 - 10 °C abgekühlt und Essigsäureanhydrid (15.7 l, 17 kg, 166 mol) wurde über eine Zeitspanne von 2 h bei dieser Innentemperatur zudosiert (exotherme Reaktion). Anschließend wurde der pH-Wert kontrolliert und 30 gegebenenfalls mit Natronlauge auf mindestens pH = 11 eingestellt. Es wurde 1 h bei einer Innentemperatur von 5 - 10 °C gerührt. Dann wurde auf eine Innentemperatur von ca. 23 °C erwärmt und weitere 2 h gerührt. Der pH = 11 wurde

dabei stündlich kontrolliert. Nach Ablauf der Reaktion (DC-Kontrolle Essigester/Methanol/Eisessig/ Wasser 70/30/5/5, R_f [Acetyl-cyclohexylglycin] = 0.83, R_f [Cyclohexylglycin] = 0.55) wurde auf eine Innentemperatur von 5 - 10 °C abgekühlt. Durch langsame Zugabe von Salzsäure (30 %ig, ca. 36 l) bei einer

- 5 Innentemperatur von 5 - 10 °C wurde ein pH = 3 eingestellt. Es wurde weitere 15 min gerührt und dann filtriert. Der erhaltene Feststoff wurde zweimal mit Wasser (je 45 l) gewaschen und bei 60 °C im Vakuum getrocknet. Ausbeute 11.52 kg (96.7 % d. Th.). Schmp. 195 - 197 °C; MS (DCI): m/z (%) = 200.2 ([M⁺ + H], 100); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.9 - 1.3 (m, 5H), 1.5 - 1.8 (m, 6H), 1.86 (s, 3H), 4.1 (dd, J₁ = 8 Hz, J₂ = 6 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8 Hz, 1H), 12.47 (s, 1 H); IR (KBr): ν = 3339.7, 2929.3, 1699.9, 1615.7, 1563.2 cm⁻¹.

Beispiel 4: (S)-Cyclohexylglycin durch enzymatische Entacetylierung von (R,S)-N-Acetyl-cyclohexylglycin

15

Zu Natronlauge (3.65 l, 33 %ig) in Wasser (143 l) wurde bei Raumtemperatur unter Röhren (R,S)-N-Acetyl-cyclohexylglycin (7.95 kg, 39.9 mol) zugegeben. Mit Salzsäure (2 N, ca. 0.8 l) wurde unter Röhren ein pH-Wert von 7.8 eingestellt. Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat (13.8 g, 0.058 mol) wurde unter Röhren zugegeben.

- 20 Dann wurde auf eine Innentemperatur von 38 - 40 °C erwärmt. Bei konstanter Innentemperatur wurde Acylase "Amano" 30.000 (40 g, in 400 ml Wasser) unter langsamem Röhren zugegeben. Man rührte langsam für 41 h; dabei fiel das (S)- Cyclohexylglycin langsam aus. Mit Salzsäure (30 %ig) wurde vorsichtig ein pH-Wert von 5.5 - 6.0 eingestellt. Es wurde auf eine Innentemperatur von 2 - 5 °C abgekühlt
- 25 und 1 h gerührt. Das ausgefallene (S)-Cyclohexylglycin wurde abfiltriert, mit Wasser (ca. 16 l) gewaschen und im Vakuum bei 60 °C getrocknet. Ausbeute: 2.79 kg (44.5 %). Schmp. > 300 °C; [α]_D 32.1 ° (c = 1, 1 N HCl); ee = 99.78 % (GC-Analyse an Chirasil L-Val nach Derivatisierung mit Propanol/HCl und Perfluorpropionsäureanhydrid); MS (DCI): m/z (%) = 158 ([M⁺ + H], 100); ¹H-NMR (200 MHz, TFA): δ = 1.1 - 1.6 (m, 5H), 1.7 - 2.1 (m, 5H), 2.1 - 2.3 (m, 1H), 4.3 (d, J = 4 Hz, 1H), 11.6 (s, 1H); IR (KBr): ν = 2927.7, 1583.9, 1508.8 cm⁻¹.

Zur Zurückgewinnung des nicht umgesetzten (R)-N-Acetyl-cyclohexylglycins wurde die Mutterlauge bei einer Innentemperatur von 2 - 5 °C mit Salzsäure (30 %ig, ca. 4.3 l) auf pH = 1 gestellt und 1 h bei 2 - 5 °C gerührt. Das ausgefallene (R)-N-Acetyl-cyclohexylglycin wurde abfiltriert, mit Wasser (ca. 16 l) gewaschen und im 5 Vakuum bei 60 °C getrocknet. Ausbeute: 3.76 kg (47.3 %). Schmp. > 210 - 212 °C; $[\alpha]_D$ -23.5 ° (c = 1, Methanol); ee = 98.39 % (GC-Analyse an Chirasil L-Val nach Derivatisierung mit Propanol/HCl oder Methanol/HCl). $^1\text{H-NMR}$ -, MS- und IR-Daten waren in Übereinstimmung mit den Daten des racemischen Ausgangsmaterials 4.

10 Beispiel 5: (R,S)-N-Acetyl-cyclohexylglycin durch Racemisierung von (R)-N-Acetyl-cyclohexylglycin

Zu (R)-N-Acetyl-cyclohexylglycin (10.9 kg, 54.7 mol) wurden unter Stickstoff Eisessig (24.5 l) und Essigsäureanhydrid (1.7 l) unter Rühren zugegeben. Die 15 Innentemperatur wurde auf 115 °C erhöht und bei dieser Temperatur wurde 3.5 h gerührt. Die Innentemperatur wurde dann auf ca. 20 °C gesenkt und Wasser (73 l) wurde zugegeben. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches betrug 2. Man rührte 1 h bei 0 - 3 °C, filtrierte den entstandenen Feststoff ab, wusch ihn zweimal mit Wasser (je 25 l) und trocknete die Substanz bei 60 °C im Vakuum. Ausbeute: 7.95 kg (73 %) 20 d. Th.) (R,S)-N-Acetyl-cyclohexylglycin. Schmp. 195 - 196 °C; $[\alpha]_D$ 0 ° (c = 1, Methanol). $^1\text{H-NMR}$ -, MS- und IR-Daten waren in Übereinstimmung mit den Daten des im Beispiel 3 erhaltenen Produkts. Die Mutterlauge enthielt weitere ca. 2 kg (R,S)-N-Acetyl-cyclohexylglycin.

25 Beispiel 6: (S)-Cyclohexylglycin durch racemisierungsfreie Hydrierung von (S)-Phenylglycin

In einem Hydrierapparat aus Emaille oder Hastelloy wurde unter Stickstoff zur Lösung von konz. Schwefelsäure (97 %ig, 60 g) in entsalztem Wasser (0.70 l) unter 30 Rühren bei 50 °C (S)-Phenylglycin (90 g, 0.53 mol; Gehalt an R-Isomer <1 %) zugegeben. Nachdem das gesamte Phenylglycin in Lösung gegangen war (gegebenenfalls wurde zusätzliche Schwefelsäure (ca. 5 ml) zugesetzt), wurde

Rhodium auf Kohle (6.3 g, 5 %, wassernass (50 % Wasser), Fa. Engelhard Typ 5% RH Carb Polcere Escat 30 M, Engelhard Code 8000) zugegeben. Der Hydrierapparat wurde verschlossen und mit Stickstoff inertisiert. Es wurde auf eine Innentemperatur von 80 °C erwärmt und ein Wasserstoffdruck von 20 bar eingestellt. Die Gesamtdauer der Hydrierung betrug 5 - 6 h, die Wasserstoffsaufnahme ca. 37 l. Nach beendeter Wasserstoffsaufnahme wurde weitere 30 - 60 min bei 20 bar nachhydriert. Anschließend wurde auf 50 °C Innentemperatur abgekühlt und der Katalysator bei 50 °C über ein Druckfilter abfiltriert. Es wurde mit entsalztem Wasser (0.30 l) nachgewaschen und das Filtrat 10 bei 20 °C durch Zugabe von konz. Natronlauge (33 %ig, ca. 90 ml) auf pH = 4 eingestellt. Es wurde 30 min nachgerührt, das ausgefallene Produkt abgesaugt und mit entsalztem Wasser (insgesamt ca. 0.85 l) gewaschen, bis das Waschwasser frei von Sulfat-Ionen war. Das feuchte Produkt (ca. 150 g) wurde bei 50 °C im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 80 - 84 g (86 - 90 % d. Th.) (S)-Cyclohexylglycin.

15 Optische Reinheit: 99.3 % ee.

Beispiel 7: (S)-2-[2-Acetylamino-3-(4-cyan-phenyl)-acryloylamino]-2-cyclohexyl-essigsäure

20 (S)-Cyclohexylglycin (3.14 kg, 20 mol) wurde in Aceton (70 l) unter Röhren auf 35 °C erhitzt. Dann wurden unter Röhren 1 N Natronlauge (20 l) innerhalb von 10 min zugegeben. Nach Aufheizen auf 40 °C wurde unter kräftigem Röhren 4-(2-Methyl-5-oxo-oxazol-4-ylidenmethyl)-benzonitril (4.66 kg, 22 mol) als Feststoff bei 40 °C Innentemperatur in Portionen innerhalb von 20 min zudosiert. Nach beendeter 25 Zugabe wurde das Reaktionsgemisch 1 h bei 40 °C Innentemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung über eine mit einem Seitzfilter K1000 und Aktivkohle (1 kg) belegte Drucknutsche filtriert und mit 10 l Aceton nachgespült. Danach wurde das Filtrat auf 14 °C abgekühlt. Dann wurden unter Röhren 2 N Salzsäure (ca. 10 l) innerhalb 10 min zugegeben bis ein pH-Wert von 2.3 erreicht 30 war. Es wurde 15 min nachgerührt und der pH-Wert mit 2 N HCl nachjustiert. Danach wurde die Lösung unter Röhren innerhalb 20 min mit entsalztem Wasser (160 l) versetzt, wobei die Titelverbindung ausfiel. Die Mischung wurde unter

Rühren auf 0 °C gekühlt und 1 h bei dieser Temperatur nachgerührt. Das Produkt wurde zur Isolierung auf eine Zentrifuge gepumpt, dreimal mit Wasser (je 10 l) gewaschen, trockengeschleudert und bei 40 °C im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 4.21 kg (11.4 mol, 57 % d. Th.). Schmp.: 196 - 198 °C; MS(ESI⁺): m/z = 370.2
 5 [M+H⁺]; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.98 - 1.35 (m, 5H), 1.48 - 1.90 (m, 6H),
 1.99 (s, 3H), 4.20 (dd, 1H), 6.98 (s, 1H), 7.72 (d, 2H), 7.88 (d, 2H), 8.02 (d, 1H),
 9.58 (s, 1H), 12.65 (br s, 1H).

Beispiel 8: (S)-2-[(S)-2-Acetylamino-3-(4-cyan-phenyl)-propionylamino]-2-
 10 cyclohexyl-essigsäure

- In einem Autoklaven wurde (S)-[2-Acetylamino-3-(4-cyan-phenyl)-acryloylamino]-cyclohexyl-essigsäure 8 (7.94 kg, 21.5 mol) in Methanol (100.0 l) vorgelegt und der Autoklav sorgfältig mit Stickstoff inertisiert. Die Katalysatorlösung wurde wie folgt
 15 hergestellt: Methanol (3.0 l) wurde unter Einleiten von Argon 15 min im Ultraschallbad behandelt. Dann wurden nacheinander unter Sauerstoffausschluss (+)-BPPM (10.92 g, 19.65 mmol) und [Rh(COD)Cl]₂ (4.88 g, 9.75 mmol) zugegeben und weitere 30 min im Ultraschallbad belassen. Dann wurde die gelb-orange Katalysatorlösung unter Ausschluss von Sauerstoff in den Autoklaven eingepumpt.
- 20 Es wurde dreimal ca. 3 bar Wasserstoff aufgedrückt und sofort wieder entspannt. Nach Erwärmen des Reaktionsgemisches auf eine Innentemperatur von 40 °C wurden 10 bar Wasserstoff aufgedrückt und unter Rühren bei 40 °C 20 h hydriert. Dann wurde der Autoklav mit Stickstoff gespült. Anschließend wurde die Hydrierlösung über ein Seitzfilter filtriert. Das Filtrat wurde auf 50 °C erwärmt,
 25 entsalztes Wasser (110 l) wurde innerhalb von 30 min zulaufen gelassen und noch 1 h bei 50 °C nachgerührt. Dann wurde auf 15 °C gekühlt und 1 h bei 15 °C nachgerührt. Das ausgefallene Produkt wurde durch Filtration über eine Drucknutsche isoliert, mit entsalztem Wasser (20 l) gewaschen und im Vakuum bei 40 °C getrocknet. Ausbeute: 7.73 kg (20.81 mol, 96.7 % d. Th.). Schmp.: 209 - 211
 30 °C; MS (ESI⁺): m/z = 372.2 [M+H⁺]; ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 0.95 - 1.38 (m, 5H),
 1.47 - 1.80 (m, 6H), 1.72 (s, 3H), 3.10 (2x dd, 2H), 4.15 (dd, 1H), 4.70 (m, 1H), 7.47 (d, 2H), 7.65 (d, 2H), 8.08 (d, 1H), 8.12 (d, 1H), 12.60 (br s, 1H).

Beispiel 9: (S)-[(S)-2-Acetylamino-3-(4-amidino-phenyl)-propionylamino]-2-cyclohexyl-essigsäure-Betain

5 Zu [2-(S)-Acetylamino-3-(4-cyan-phenyl)-propionylamino]-(S)-cyclohexyl-essigsäure (3.77 kg, 10.1 mol) und Hydroxylamin-Hydrochlorid (1.06 kg, 15.2 mol) wurden unter Rühren Methanol (20 l) zulaufen gelassen. Das Gemisch wurde 10 min gerührt, dann wurde Natriumhydrogencarbonat (2.52 kg, 30 mol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde innerhalb 1 h langsam (Kohlendioxid-Entwicklung!) auf 10 eine Innentemperatur von 55 °C erwärmt, dann ca. 6 h bei 55 °C gerührt und über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Das ausgefallene Natriumchlorid wurde über ein Seitzfilter abgesaugt und mit Methanol (4 l) nachgewaschen. Die Methanol-Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei ca. 40 °C Badtemperatur auf ca. 10 l eingeengt und unter gutem Rühren zu Isopropanol (60 l) zugetropft. Dabei 15 fiel das Natriumsalz des N-Hydroxyamidins aus. Zur Vervollständigung der Fällung engte man bei ca. 40 °C unter gutem Rühren im Vakuum auf ca. 50 l ein. Dann ließ man noch 1 h bei 15 °C nachröhren und filtrierte das Produkt über eine Drucknutsche ab. Der Niederschlag wurde mit Isopropanol (10 l) nachgewaschen und im Stickstoffstrom über Nacht auf der Nutsche getrocknet.

20

Das erhaltene Natriumsalz des N-Hydroxyamidins wurde danach direkt in die nachfolgende Hydrierung eingesetzt. Dazu wurde in einem Autoklaven Eisessig (26 l) vorgelegt und das Natriumsalz des N-Hydroxyamidins (ca. 6.2 kg, feuchtes Rohprodukt aus obiger Reaktion) portionsweise unter Rühren zugegeben. Zu der 25 Lösung gab man eine Suspension von Palladium auf Kohle (10 %ig, 50 % Wasser; 0.40 kg) in Eisessig (1 l). Der Autoklav wurde zuerst mit Stickstoff, dann mit Wasserstoff gespült, dann wurde bei 50 °C und 18 bar Wasserstoff-Druck 72 h hydriert. Man ließ auf Raumtemperatur abkühlen, filtrierte das Reaktionsgemisch unter Stickstoff über einen mit Aktivkohle belegten Klärschicht-Seitzfilter und wusch 30 mit Eisessig (2 l) nach. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bei 50 °C Badtemperatur eingedampft, bis kein Eisessig mehr abdestillierte und Kristallisation einsetzte. Dann ließ man das Gemisch auf ca. 25 °C abkühlen und zog unter

Rotieren Ethylacetat (20 l) in die Kugel des Rotationsverdampfers ein, wobei das Amidin als Essigsäuresalz ausfiel. Nach 0.5 h Nachröhren saugte man den Niederschlag über einen Papierfilter ab und saugte gut trocken.

- 5 Das wie vorstehend erhaltene rohe Amidiniumacetat wurde unter gutem Rühren in entsalztes Wasser (20 l), das auf 40 °C erwärmt war, eingetragen und das Gemisch bis zur klaren Lösung auf 80 °C erhitzt. Dann wurde das Gemisch unter gutem Rühren innerhalb 30 min auf 15 °C abgekühlt. Hierbei fiel die Titelverbindung (als Betain) aus. Es wurde 1 h bei 15 °C nachgerührt und das ausgefallene Produkt 10 über eine Drucknutsche abfiltriert. Der Filterkuchen wurde mit Eiwasser (6 l) gewaschen, im Stickstoffstrom gut getrocknet, in einen Kessel transferiert und unter Stickstoff 1 h mit 40 l Aceton bei Raumtemperatur gerührt. Das ausgefallene Produkt wurde über eine Drucknutsche abfiltriert, mit Aceton (ca. 10 l) gewaschen und im Vakuum bei 40 °C getrocknet. Ausbeute: 2.58 kg (6.64 mol, 65.7 % d. Th.)
- 15 der Titelverbindung. MS (ESI⁺): m/z = 389.3 [M+H⁺]; ¹H-NMR (Methanol-d₄): δ = 0.98 - 1.38 (m, 5H), 1.58 - 1.78 (m, 6H), 1.96 (s, 3H), 3.10 (2x dd, 2H), 4.02 (d, 1H), 4.61 (dd, 1H), 7.42 (d, 2H), 7.68 (d, 2H).

Beispiel 10: 2-Methyl-4-[pyridin-3-yl-(Z)-methylen]-4H-oxazol-5-on

20

Zu N-Acetylglycin (32.7 kg, 280.0 mol) und Natriumacetat (15.3 kg, 186.9 mol) ließ man unter Stickstoff Aceton (40.0 l), gefolgt von Pyridin-3-carbaldehyd (20.0 kg, 186.9 mol), zulaufen. Unter Rühren ließ man Essigsäureanhydrid (40.0 l, 429.0 mol) zulaufen. Innerhalb 30 min wurde das Reaktionsgemisch auf

- 25 Rückflusstemperatur hochgeheizt, dann 1.5 h unter Rückfluss gerührt. Es entstand eine dünne, rötliche Suspension. Sie wurde auf 50 °C abgekühlt, dann Methyl-tert-butylether (80.0 l) zulaufen gelassen. Man ließ Eiwasser (< 2 °C, 200.0 l) unter Rühren und Kühlung so schnell wie möglich (< 5 min) zulaufen und rührte dann 1 h bei 5 - 10 °C. Die beige Suspension wurde auf eine mit Stickstoff inertisierte
- 30 Zentrifuge gedrückt. Der Niederschlag wurde abgeschleudert, mit entsalztem Wasser (80.0 l) gewaschen und im Vakuum bei 40 °C getrocknet. Ausbeute: 24.8 kg (131.9 mol, 70.6 % d. Th.). Schmp.: 173 °C; MS (DCI): m/z (%) = 189 ([M + H⁺],

100); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.40 (s, 3H), 7.28 (s, 1H), 7.53 (dd, 1H), 8.61 (d, 2H), 9.18 (br s, 1H); IR (KBr): ν = 1799.9, 1777.4, 898.0 cm⁻¹.

Beispiel 11: 3-(2-Acetylamino-2-methoxycarbonyl-vinyl)-pyridinium-Tetrafluoroborat

5

Eine Suspension von 2-Methyl-4-[pyridin-3-yl-(Z)-methylen]-4H-oxazol-5-on (12.0 kg, 63.83 mol) in Methanol (120.0 l) wurde unter Stickstoff auf 60 °C erwärmt.

Triethylamin (0.5 l) wurde zugepumpt und mit Methanol (0.5 l) nachgespült (an einer entnommenen Probe wurde per Glaselektrode ein pH-Wert von 8.15

10 gemessen). Innerhalb von 30 min wurde die Reaktionslösung auf 30 °C abgekühlt.

Tetrafluorborsäure-Lösung (48 %ig in Wasser, 11.8 kg, 64.5 mol) wurde innerhalb 30 min zugegeben. Es wurde innerhalb 1 h auf 10 °C Innentemperatur abgekühlt und (falls notwendig nach Animpfen) die Suspension weitere 3 h bei 10 °C gerührt.

Man ließ Methyl-tert-butylether (40.0 l) zulaufen und rührte 1 h bei 10 °C. Das

15 Produkt wurde auf eine mit Stickstoff inertisierte Zentrifuge gedrückt, abgeschleudert, mit Methyl-tert-butylether (20.0 l) gewaschen und bei 40 °C im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 18.7 kg (60.71 mol, 95.1 % d. Th.). Schmp.: 179.4 °C; MS (ESI⁺): m/z (%) = 221 ([M + H⁺] der freien Base, 100); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.01 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 7.21 (s, 1H), 7.89 (dd, 1H), 8.48 (d, 1H), 20 8.76 (d, 1H), 8.98 (s, 1H), 9.92 (s, 1H); IR (KBr): ν = 1726.9, 1670.1, 1091.5 cm⁻¹.

Beispiel 12: (S)-3-(2-Acetylamino-2-methoxycarbonyl-ethyl)-pyridinium-Tetrafluoroborat

25 3-(2-Acetylamino-2-methoxycarbonyl-vinyl)-pyridinium-tetrafluoroborat (10.3 kg, 33.44 mol) wurde in einem Autoklaven in Methanol (120.0 l) gelöst. Man ließ Tetrafluorborsäure-Lösung (50 %ig in Wasser, 1.018 kg, 5.8 mol) zulaufen,

verschloss den Autoklaven und inertisierte ihn sorgfältig mit Stickstoff. Die

Katalysatorlösung wurde hergestellt, indem Methanol (3.0 l) unter Einleiten von

30 Argon 15 min im Ultraschallbad behandelt wurde. Zum so entgasten Methanol wurde unter Luftausschluss (+)-Phenyl-CAPP (12.5 g, 20.83 mmol) und

[Rh(COD)Cl]₂ (5.0 g, 10.10 mmol) gegeben und die gelb-orange Katalysatorlösung

- 30 min unter Argon beschallt. Die Katalysatorlösung wurde unter Ausschluss von Sauerstoff in den Autoklaven eingezogen. Der Autoklaveninhalt wurde innerhalb 1 h auf 40 °C erwärmt. Dreimal wurden jeweils ca. 3 bar Wasserstoff aufgedrückt und sofort wieder entspannt. Dann wurden 1.5 bar Wasserstoff aufgedrückt und unter 5 intensivem Rühren bei 50 °C hydriert. Nach 7 h kam die Hydrierung zum Stillstand.
- Die HPLC-Analyse einer entnommenen Probe ergab, dass zu diesem Zeitpunkt 99.1 % der Titelverbindung vorlag und die GC-Analyse (30 m Fused Silica Kapillarsäule Chirasil Val, isotherm 160 °C, Injektor 220 °C, Detektor (FID) 260 °C, 0.8 bar Wasserstoff als Trägergas, t_{ret} [(R)-Enantiomer] 12.64 min, t_{ret} [(S)-6 Enantiomer] 13.64 min) ergab, dass die Enantiomerenreinheit 86 % ee an (S)-Isomerem betrug. Der Autoklav wurde mit Stickstoff gespült, der Autoklaveninhalt mit Stickstoff über einen Seitzfilter in einen Kessel gedrückt und das Filtrat dort bei +5 °C unter Stickstoff aufbewahrt.
- 15 Nach der vorstehenden Vorgehensweise wurden vier weitere asymmetrische Hydrierungen durchgeführt (Ansatzgröße 8.0 kg (25.97 mmol) - 10.3 kg (33.44 mol); Wasserstoffdruck 2 - 10 bar; Temperatur 40 °C; Hydrierzeit 4 - 6 h; Produktgehalt 98.0 - 99.8 % (HPLC); Enantiomerenreinheit des rohen Produkts in der Hydrierlösung 62.0 - 84.5 % ee an S-Isomer (GC)).
- 20 Die Filtrate der fünf Ansätze wurden vereinigt und bei einer Manteltemperatur von 40 °C im Vakuum auf 150 l Restvolumen eingeengt. Es wurde Isopropanol (200 l) zugegeben, bei einer Manteltemperatur von 40 °C im Vakuum bis auf ein Restvolumen von 250 l eingeengt und noch zwei weitere Male Isopropanol (jeweils 25 100 l) zugegeben und bei einer Manteltemperatur von 40 °C jeweils wieder bis auf ein Restvolumen von 250 l eingeengt. Dabei kristallisierte die Titelverbindung aus. Die weiße Suspension wurde 1 h bei 10 °C unter Stickstoff gerührt. Das Produkt wurde über eine mit Stickstoff inertisierte Zentrifuge abgeschleudert und mit Isopropanol (100 l) und mit Methyl-tert-butylether (150 l) gewaschen. Es wurden 30 45.0 kg (144.7 mol, 90.6 % d. Th.) der Titelverbindung mit 71 % ee an (S)-Isomeren (GC) erhalten. Schmp.: 126.2 °C (gemäß DSC); MS (ESI⁺): m/z (%) = 223 ([M + H⁺] der freien Base, 100); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.78 (s, 3H), 3.08 (dd, J =

9.5 und 7 Hz, 1H), 3.29 (dd, $J = 9.5$ und 4 Hz, 1H), 4.68 (m, 1H), 8.00 (dd, $J = 5.0$ und 4.5 Hz, 1H), 8.42 (t oder 2 d, J ca. 6 Hz, 2H), 8.80 (d, J ca. 5 Hz, 1H), 8.82 (s, 1H); IR (KBr): $\nu = 1740.9, 1654.3 \text{ cm}^{-1}$.

5 Beispiel 13: (S)-2-Benzylloxycarbonylamino-3-(pyridin-3-yl)-propionsäure

Eine Lösung von (S)-3-(2-Acetylamino-2-methoxycarbonyl-ethyl)-pyridinium-tetrafluoroborat (71 % ee; 6.70 kg, 21.6 mol) in Wasser (88 l) wurde über eine Drucknutsche, belegt mit Aktivkohle (0.5 kg), filtriert. Mit konz. Natronlauge (33 %ig, ca. 3.0 l) wurde der pH-Wert des Filtrats auf 10 - 11 gestellt und die Lösung dann 2 h bei 20 - 25 °C gerührt, wobei der pH-Wert mit konz. Natronlauge konstant gehalten wurde. DC-Kontrolle (Laufmittel Ethylacetat/Methanol/Wasser/Essigsäure 70/30/5/5) zeigte vollständige Verseifung des Methylesters zur Carbonsäure an. Mit konz. Salzsäure (ca. 150 ml) wurde ein pH-Wert von 8.0 eingestellt. Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat (11.7 g, 0.049 mol) wurde zugegeben, das Reaktionsgemisch auf eine Innentemperatur von 40 °C erwärmt und 1 h bei einer konstanten Temperatur von 39 °C gerührt. Acylase "Amano" 30.000 (38.0 g) in entsalztem Wasser (400 ml) wurde bei 39 °C unter sehr langsamem Rühren zugegeben und das Gemisch dann 40 h bei einem konstanten pH-Wert von 7.9 und einer konstanten Temperatur von 39 °C gerührt. DC-Kontrolle (Laufmittel wie oben) bestätigte, dass ca. 85 % der Carbonsäure (entsprechend dem Gehalt an (S)-Isomer im eingesetzten 3-(2-Acetylamino-2-methoxycarbonyl-ethyl)-pyridinium-tetrafluoroborat) entacetyliert worden war. Nach Inertisierung des Kessels mit Stickstoff wurde Tetrahydrofuran (22.0 l) zulaufen gelassen und das Reaktionsgemisch innerhalb 1 h auf eine Innentemperatur von 10 °C abgekühlt. Eine Lösung von N-(Benzylloxycarbonyloxy)-succinimid (4.63 kg, 18.6 mol) in Tetrahydrofuran (23.0 l) wurde innerhalb 45 min zugegeben, wobei der pH-Wert durch kontinuierliche Zugabe von konz. Natronlauge (33 %ig) bei 8.0 - 8.5 gehalten wurde. Das Gemisch wurde dann 1.5 h bei 20 °C gerührt. DC-Kontrolle (Laufmittel wie oben) zeigte vollständige Acylierung der freien Aminosäure an. Man ließ zu dem Reaktionsgemisch Ethylacetat (60 l) zulaufen und rührte 15 min kräftig. Nach gründlicher Phasentrennung wurde die Ethylacetat-Phase abgetrennt und

verworfen. Die Wasserphase wurde mit konz. Salzsäure (ca. 3.7 l) auf einen pH-Wert von 5.0 gestellt und, nachdem Impfkristalle der enantiomerenreinen Titelverbindung zugesetzt worden waren, die Suspension über Nacht bei 5 °C gerührt. Die Kristalle wurden unter Stickstoff über eine Drucknutsche filtriert, mit 5 entsalztem Wasser (20 l) gewaschen und bei 48 °C im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.86 kg (9.52 mol, 51.9 % d. Th.) der Titelverbindung mit 100 % ee (CSP Chiralpak AD 250 x 4.6 mm Daicel; Eluent: Isopropanol/Ethanol/n-Hexan 12/4/84 + 0.1 % Diethylamin; t_{ret} 14.16 min), $[\alpha]_D^{20} -9.95^\circ$ (c = 1.0, Methanol). Schmp.: 173 - 174 °C (aus DSC); MS (ESI $^+$): m/z (%) = 301 ([M + H $^+$], 100); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, 10 DMSO-d₆): δ = 2.85 (dd, J = 9.5 und 7.5 Hz, 1H), 3.10 (dd, J = 9.5 und 3.5 Hz, 1H), 4.23 (m, 1H), 4.98 (s, 2H), 7.15 - 7.40 (m, 6H), 7.62 - 7.78 (m, 2H), 8.38 - 8.50 (m, 2H), 12.80 (br s, 1H); IR (KBr): ν = 3369.7, 1707.4, 1504.7, 1046.9, 699.2 cm⁻¹.

Beispiel 14: (S)-[1-Carbamoyl-2-(pyridin-3-yl)-ethyl]-carbaminsäurebenzylester
15

Eine Suspension von (S)-2-Benzylloxycarbonylamino-3-(pyridin-3-yl)-propionsäure (2.60 kg, 8.65 mol) in Tetrahydrofuran (60 l) wurde auf -9 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurde innerhalb 5 min N-Ethyldiisopropylamin (1.33 kg, 10.29 mol) zulaufen gelassen. Anschließend wurde bei -9 °C innerhalb 20 min 20 Chlorameisensäure-isobutylester (1.36 kg, 9.96 mol) zulaufen gelassen, wobei die Innentemperatur am Ende auf -6 °C anstieg. In die entstandene dünne Suspension wurde nach 10 min unter heftigem Rühren bei einer konstanten Temperatur von (-5) - (-6) °C innerhalb 3 h Ammoniakgas (2.1 kg, ca. 123 mol) eingeleitet. Die Reaktion war anfangs stark exotherm (zunächst langsames Einleiten erforderlich), 25 später weniger exotherm. Das Reaktionsgemisch wurde innerhalb 30 min auf 16 °C erwärmt, wobei sich ein dicker, aber noch rührbarer Kristallbrei bildete. Das Lösungsmittel wurde bei 30 °C Manteltemperatur im Vakuum entfernt. Der weiße, schmierige Rückstand wurde in Ethylacetat (125 l) suspendiert. Man ließ eine Lösung von Natriumhydrogencarbonat (3.0 kg) in Wasser (50 l) zulaufen und rührte 30 30 min heftig durch, wobei sämtlicher Feststoff in Lösung ging. Man trennte die organische Phase ab, trocknete sie über Natriumsulfat (1.0 kg), filtrierte das Trockenmittel ab und engte das Filtrat im Vakuum bei 30 °C Badtemperatur auf ein

Volumen von ca. 6 l ein. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt, mit Ethylacetat (1.5 l) gewaschen und bei 30 °C im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 2.26 kg (7.55 mol, 87.3 % d. Th.). Die chemische Reinheit betrug 99.9 % (HPLC: 125 x 4.0 mm RP18 Purospher, 40 °C, Detektion 210 nm); die Enantiomerenreinheit 5 betrug 100 % ee (HPLC: 250 x 4.6 mm CSP Chiralpak AD Daicel, 40 °C; Detektion 248 nm; Eluent: n-Hexan/Isopropanol/Ethanol 84/12/4 + 0.1 % Diethylamin; t_{ret} [(S)-Isomer] 14.93 min). Schmp.: 152.8 °C (aus DSC); MS (ESI $^+$): m/z (%): 300 ([M + H $^+$], 100); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.77 (dd, J = 9.5 und 7.0 Hz, 1H), 3.02 (dd, J = 9.5 und 3.5 Hz, 1H), 4.19 (m, 1H), 4.96 (s, 3H), 7.00 - 7.40 (m, 7H), 10 7.40 - 7.60 (m, 2H), 7.60 - 7.76 (m, 1H), 8.36 - 8.53 (m, 2H); IR (KBr): ν = 3306.8, 1674.9, 1537.7, 1424.0, 1271.6, 1251.3 cm $^{-1}$.

Beispiel 15: 3-((S)-2-Ammonio-2-carbamoyl-ethyl)-1-methyl-pyridinium-ditosylat

15 Zu (S)-[1-Carbamoyl-2-(pyridin-3-yl)-ethyl]-carbaminsäurebenzylester (1.00 kg, 3.33 mol) und Toluol-4-sulfonsäuremethylester (0.67 kg, 3.6 mol) in einem Autoklaven wurde Isopropanol (1.7 l) zugegeben, der Rührer eingeschaltet und das Reaktionsgemisch unter Stickstoff im verschlossenen Autoklaven 5 h bei 50 °C gerührt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen 20 gelassen, wobei sich die methylierte N-Benzylloxycarbonylverbindung als zäher Schleim am Boden absetzte. Die Reaktionslösung wurde mit entsalztem Wasser (0.33 l) verdünnt und dann Palladium/Kohle (10 %ig, 50 % Wasser; 50 g) zugegeben. Die Hydrierung erfolgte drucklos unter Durchleiten von Wasserstoff (ca. 10 l/min) und unter kontinuierlicher Zudosierung einer Lösung von Toluol-4-25 sulfonsäure-Monohydrat (0.63 kg, 3.33 mol) in entsalztem Wasser (1.0 l) bei 20 - 25 °C innerhalb von ca. 3 h. Nach beendeter Hydrierung wurde der Autoklav mit Stickstoff gespült, die Hydrierlösung über einen Seitzfilter filtriert und mit entsalztem Wasser (0.5 l) nachgewaschen. Das Filtrat wurde in einen Rotationsverdampfer überführt und im Dampfstrahlvakuum bei 40 °C Badtemperatur auf ca. 2.5 l 30 eingeengt. Dann wurde unter gutem Rühren Isopropanol (10 l) eingezogen und wieder unter Rühren im Vakuum bei 40 °C Badtemperatur auf ca. 5 l eingeengt. Dabei begann die Titelverbindung auszukristallisieren. Die Kristallsuspension wurde

unter Rühren 0.5 h auf 15 °C gekühlt und das Produkt über einen Papierfilter abgesaugt, mit 1 l Isopropanol nachgewaschen, gut trockengesaugt und getrocknet. Ausbeute: 1.57 kg (3.0 mol, 90 % d. Th.). Schmp.: 219 - 220 °C; MS (ESI⁺): m/z (%) = 180.1 ([M+H⁺], 100); ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 2.30 (s, 3H), 3.10 - 5 3.40 (m, 2H), 4.08 (dd, 1H), 4.35 (s, 3H), 7.12 (d, 4H), 7.48 (d, 4H), 7.70 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 8.05 - 8.22 (m, 4H), 8.42 (m, 1H), 8.95 (m, 1H).

Beispiel 16: 3-[(S)-2-[(S)-2-Acetylamino-3-(4-amidino-phenyl)-propionylamino]-2-cyclohexyl-acetylamino]-2-carbamoyl-ethyl}-1-methyl-pyridinium-10 ditosylat

Zur Suspension von 3-((S)-2-Ammonio-2-carbamoyl-ethyl)-1-methyl-pyridinium-ditosylat (5.43 kg, 10.36 mol) und (S)-[(S)-2-Acetylamino-3-(4-amidino-phenyl)-propionylamino]-2-cyclohexyl-essigsäure-Betain (4.00 kg, 93.15 %ig, 6.85 %

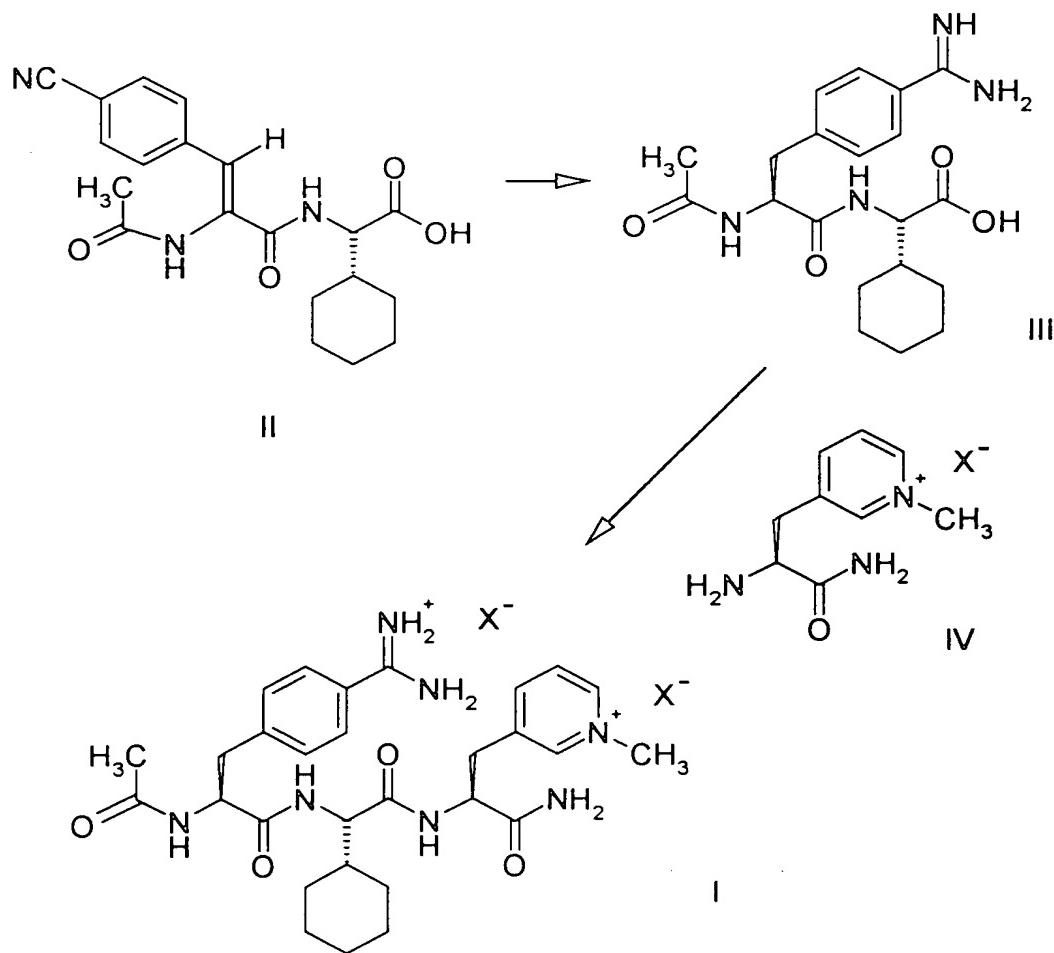
15 Wassergehalt, 9.591 mol) in N,N-Dimethylformamid (45.0 l) wurde unter Stickstoff 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (1.306 kg, 30.0 %ig auf Dicalite®, 2.40 mol) gegeben und die Suspension auf 10 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurde innerhalb 7 h gleichmäßig eine Lösung von Dicyclohexylcarbodiimid (2.56 kg, 99 %ig, 12.28 mol) in N,N-Dimethylformamid (3.4 l) zugepumpt und
20 anschließend Pumpe und Leitungen mit N,N-Dimethylformamid (0.5 l) nachgespült. Man ließ noch 1 h bei 10 °C und dann weitere 14 h unter Erwärmung auf Raumtemperatur (23.5 °C) nachröhren. Die Suspension wurde durch eine
Seitzschicht filtriert und mit einem Gemisch aus N,N-Dimethylformamid (2.2 l) und Toluol (0.2 l) nachgewaschen. Das Filtrat wurde innerhalb 30 min in einen Kessel
25 gepumpt, in dem unter Stickstoff heftig gerührtes Aceton (1200 l) bei 18 °C vorgelegt worden war. Man ließ 10 min bei Raumtemperatur nachröhren und drückte die Suspension dann mit Stickstoff über eine Drucknutsche, die mit einem Polypropylen-Filtertuch und Seitzfilter belegt worden war, ab. Man wusch mit Aceton (3 x 100 l) nach, blies den Feststoff auf der Drucknutsche über Nacht mit
30 Stickstoff trocken und wiederholte dann die Fällung des Produkts aus Aceton. Dazu wurde der Feststoff unter Rühren in N,N-Dimethylformamid (25 l) gelöst, die Lösung mit Toluol (2.5 l) versetzt und innerhalb 15 min in einen Kessel gepumpt, in dem

unter Stickstoff heftig gerührtes Aceton (1200 l) bei 18 °C vorgelegt worden war. Man ließ 10 min bei Raumtemperatur nachröhren und drückte die Suspension dann mit Stickstoff über eine Drucknutsche ab. Man wusch mit Aceton (3 x 100 l) nach. Der Feststoff wurde mit Stickstoff gut trockengeblasen und zunächst bei 20 °C im 5 Vakuum, dann bei 43 °C im Hochvakuum getrocknet. Ausbeute: 7.83 kg (8.76 mol, 91.3 % d. Th.). Die Enantiomerenreinheit betrug > 99 % ee (HPLC: CSP Chiral AGP 100 x 4.0 mm 5 µm; 40 °C, 0.7 ml/min wässrige Natriumacetat-Lösung (100 mM); t_{ret} 6.20 min, t_{ret} [Enantiomer] 4.26 min, t_{ret} [Diastereomer] 4.97 min); $[\alpha]_D^{25}$ -6.5° (c = 1.0, Wasser). Die chemische Reinheit betrug 97 %, der 10 Diastereomerengehalt 2.4 % (HPLC: Superspher 60 RPselect B 250 x 4.0 mm; 25 °C; Detektion 210 nm; 1.0 ml/min; Eluent A: 950 ml Wasser + 50 ml Acetonitril + 7 ml Orthophosphorsäure mit ca. 8 ml Triethylamin auf pH 3 eingestellt, Eluent B: 600 ml Wasser + 400 ml Acetonitril + 7 ml Orthophosphorsäure mit ca. 8 ml Triethylamin auf pH 3 eingestellt; Elutionsprogramm: 15 min 100 % Eluent A, dann 15 innerhalb 10 min linear auf 50 % Eluent A + 50 % Eluent B, dann weitere 15 min isokratisch dieses 50:50-Eluentengemisch; t_{ret} [Titel-Kation] 13.44 min, t_{ret} [Tosylat-Anion] 26.88 min). MS (FAB, NBA): m/z (%) = 722 ([M⁺] des Monotosylats, 15 %), 550 ([M⁺] des tosylatfreien Monokations (N-Methylpyridinium-amidin), 100 %); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.80 - 1.25 (m, 6H), 1.40 - 1.70 (m, 5H), 1.72 (s, 2H), 2.29 (s, 6H), 2.71 (d, 1H), 2.98 - 3.07 (m, 3H), 3.18 (dd, 1H), 4.05 (t, 1H), 4.36 (s, 3H), 4.55 - 4.65 (m, 2H), 7.11 (d, 4H), 7.27 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.47 (d, 4H), 7.51 (d, 2H), 7.73 (d, 2H), 7.92 (d, 1H), 8.06 (dd, 1H), 8.14 (d, 1H), 8.21 (d, 1H), 8.40 (d, 1H), 8.88 (m, 4H), 9.25 (s, 2H); ¹³C-NMR (75.43 MHz, DMSO-d₆, {¹H}-Breitband-entkoppelt): δ = 20.67 (2C), 22.31 (1C), 25.51 (2C), 25.65 (1C), 28.32 (1C), 28.89 (1C), 34.21 (1C), 36.95 (1C), 47.79 (1C), 52.19 (1C), 53.30 (1C), 57.67 (1C), 125.36 (4C), 125.80 (1C), 126.82 (1C), 127.70 (1C), 128.03 (4C), 129.59 (1C), 137.74 (2C), 138.13 (1C), 143.36 (1C), 144.68 (1C), 145.25 (2C), 145.37 (1C), 145.63 (1C), 165.16 (1C), 169.26 (1C), 170.58 (1C), 171.35 (2C); IR (KBr): ν = 3286, 1663, 1184, 1124, 1035, 1011, 683, 569 cm⁻¹.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel II durch katalytische Hydrierung und Überführung der Cyangruppe in die Amidinogruppe in die Verbindung der Formel III oder deren Salz mit der Säure HX überführt wird und mit einer Verbindung der Formel IV oder deren Salz mit der Säure HX zur Verbindung der Formel I umgesetzt wird, wobei die Anionen X für physiologisch verträgliche Anionen stehen.

10



2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydrierung mit einem chiralen Rhodium(I)-Komplex als Katalysator durchgeführt wird.

3. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Hydrierung mit einem Rhodium(I)-(+)-(2R,4R)-1-tert-Butyloxycarbonyl-4-diphenylphosphino-2-(diphenylphosphinomethyl)-pyrrolidin-Komplex als Katalysator 5 durchgeführt wird.

4. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Überführung der Cyangruppe in die Amidinogruppe durch Umsetzung mit Hydroxylamin oder einem Hydroxylammoniumsalz und 10 Hydrogenolyse des entstehenden N-Hydroxyamidins erfolgt.

5. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung der Verbindungen der Formeln III und IV oder von Salzen davon in Gegenwart eines Carbodiimids erfolgt.

15

6. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung der Verbindungen der Formeln III und IV oder von Salzen davon in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid und 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin erfolgt.

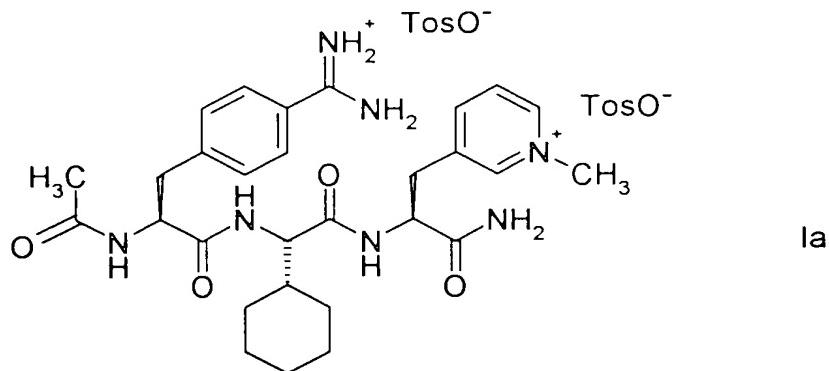
20

7. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass in die Umsetzung der Verbindungen der Formeln III und IV die Verbindung der Formel IV in Form des Salzes mit der Säure HX eingesetzt wird und die Verbindung der Formel III als solche, das heißt als Betain, eingesetzt wird.

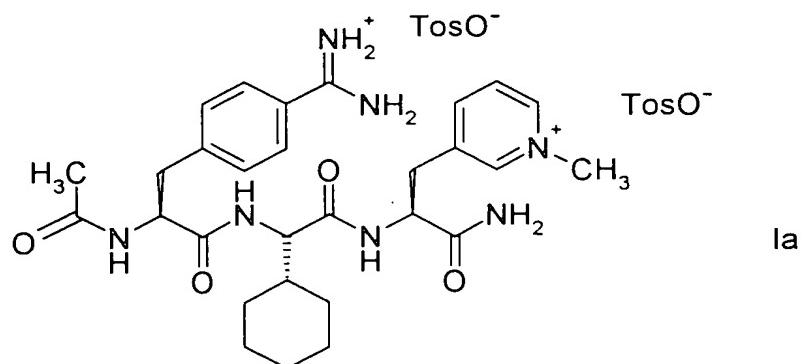
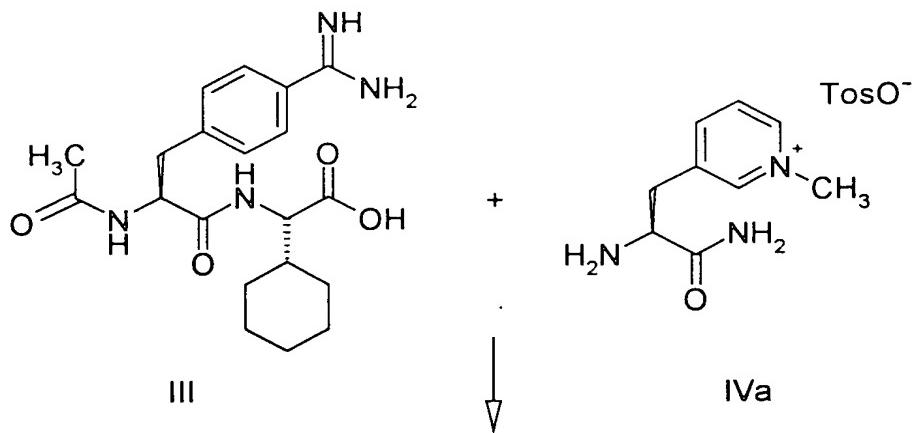
25

8. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Anion X⁻ für Toluol-4-sulfonat steht.

9. Verbindung der Formel Ia, in der das Anion TosO⁻ für Toluol-4-sulfonat steht.

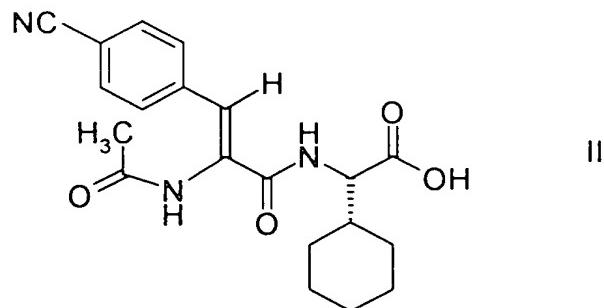


10. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel Ia, in der das Anion TosO^- für Toluol-4-sulfonat steht, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung 5 der Formel III oder das Toluol-4-sulfonsäuresalz davon mit der Verbindung der Formel IVa oder dem Toluol-4-sulfonsäuresalz davon zur Verbindung der Formel Ia umgesetzt wird.



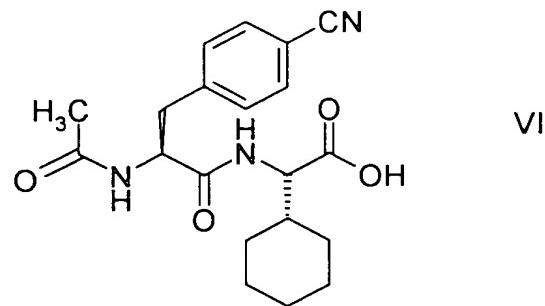
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel IVa in Form ihres Salzes mit Toluol-4-sulfonsäure eingesetzt wird und die Verbindung der Formel III als solche, das heißt als Betain, eingesetzt wird und die Umsetzung in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid und 3-Hydroxy-4-oxo-5 3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin erfolgt.

12. Verbindung der Formel II und ihre Salze.

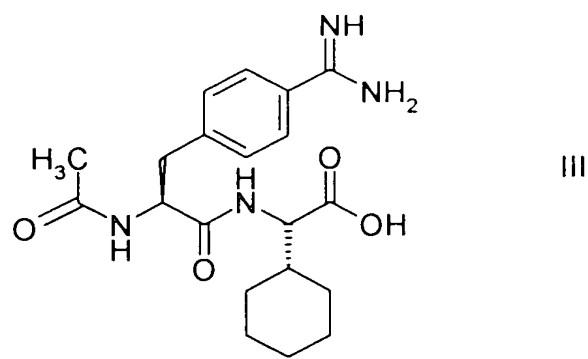


10

13. Verbindung der Formel VI und ihre Salze.



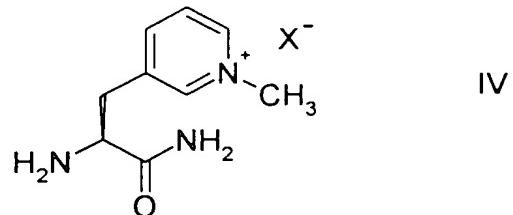
15 14. Verbindung der Formel III und ihre Salze.



15. Verbindung der Formel IV und ihre Salze mit der Säure HX, wobei das Anion X für ein physiologisch verträgliches Anion steht.



5

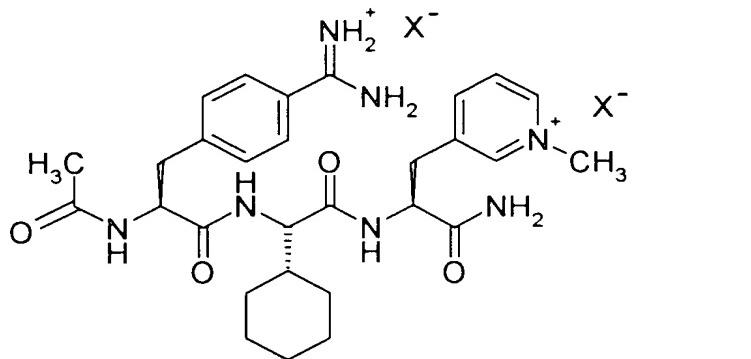


Zusammenfassung

Verfahren zur Synthese von Acetyl-amidiniophenylalanyl-cyclohexylglycyl-pyridinioalaninamiden

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von Acetyl-amidiniophenylalanyl-cyclohexylglycyl-pyridinioalaninamiden der Formel I,



10

in der die Anionen X für physiologisch verträgliche Anionen stehen, und deren Analogen, die wirksame Hemmstoffe des Blutgerinnungsfaktors Xa sind und sich zum Beispiel zur Verhinderung von Thrombosen eignen. Das erfindungsgemäße Verfahren ist gekennzeichnet durch die Kupplung von 2-[2-Acetylamino-3-(4-

15 amidinophenyl)-propionylamino]-2-cyclohexyl-essigsäure, die aus 2-[2-Acetylamino-3-(4-cyanphenyl)-acryloylamino]-2-cyclohexyl-essigsäure durch asymmetrische Hydrierung und Überführung der Cyangruppe in das Amidin erhalten wird, oder einem Salz davon, mit einem 3-(2-Amino-2-carbamoyl-ethyl)-1-methyl-pyridiniumsalz. Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Ausgangsverbindungen
 20 und Zwischenprodukte dieses Verfahrens, Verfahren zu deren Herstellung und das Acetyl-(S)-4-amidiniophenylalanyl-(S)-cyclohexylglycyl-(S)-(1-methyl-3-pyridinio)alaninamid als Ditosylat-Salz.